Genetische Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehung in den Schwanzfasergenen der Bakteriophagen P1, P7 und Mu

Wolfgang Ritthaler

Disbui. München
1989

UNIV.
LIBRARY
BUFF.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0018

Genetische Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehung in den Schwanzfasergenen der Bakteriophagen P1, P7 und Mu

Dissertation der
Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Wolfgang Ritthaler

München
Januar 1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Zillig

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 1989

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Meinen Eltern

Puste, so stark du magst; können Kinder
das Licht der Sterne ausblasen?

Alischer Novai

The first principle is that you must not fool
yourself - and you are the easiest person to fool.

Richard Feynman
(in: Surely You're Joking, Mr. Feynman)

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1983 bis Januar 1989 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dietmar Kamp am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dietmar Kamp für die Betreuung und Förderung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Zillig danke ich für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker für die Vertretung dieser Arbeit vor dem Fachbereich.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen Frau Dr. Rodica Sandulache, Frau Beate Stern und Herrn Dr. Robert Schmucker möchte ich mich für zahlreiche nützliche Diskussionen und ihre ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Für technische Hilfe habe ich Frau Marianne von Gruber, Frau Renate Koch und Frau Gabriela Sowa zu danken.

Weiterhin danke ich Frau Maria Kaßing und Herrn Thomas Dierks für ihre unverdrossene Mitarbeit bei zahlreichen Wiederholungsexperimenten.

Inhalt

A Zusammenfassung 1

B Einleitung 3

C Material und Methoden 10

1. Medien und Puffer 10

2. Verwendete Chemikalien und Enzyme 11

3. Bakterienstämme und Bakteriophagen 13

4. Plasmide und Plasmidkonstruktionen 14
4.1 Allgemein verwendete Plasmide 14
4.2 Konstruktion von Plasmiden 15
4.2.1 Sequenzspezifische Mutagenese 15
4.2.2 Konstruktion von pWR1, pWR2, pWR2-3 und pWR2-34 18
4.2.3 Konstruktion von pGP5-606 20
4.2.4 Konstruktion von pGP5-507 20
4.2.5 Konstruktion von pGP5-921 20
4.2.6 Konstruktion von pGP1-1/20 und pGP1-1/29 21

5. Mikrobiologische und genetische Methoden 21
5.1 Konstruktion lysogener Bakterienstämme 21
5.1.1 Infektion auf Nährmedien 21
5.1.2 Infektion in Flüssigkultur 22
5.2 Transformation von *E. Coli* mit Plasmid-DNA 22
5.3 Transfektion mit M13 DNA 23
5.4 Kreuzungsexperimente 23
5.5 Adsorptionstests 25
5.6 Biologischer Test auf Gin-Aktivität 26

6. Allgemeine Methoden im Umgang mit DNA 26
6.1 Fällung von DNA 26
6.2 Phenolextraktion 27
6.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen 27
6.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese und Größenberechnung der Restriktionsfragmente 28
6.5 Elektroelution von DNA-Fragmenten 30
6.6 Dephosphorylierung von DNA 30
6.7 Ligierung von DNA-Fragmenten 30

7. Phagen- und DNA-Präparation 31
7.1 Herstellung und Titerbestimmung von Phagenlysaten 31
7.2 Präparative Phagenisolierung 32
7.3 "Mini-Präparation" von Phagen-DNA 33
7.4 Präparative Plasmidisolierung 34
7.5 "Mini-Präparation" von Plasmiden 36
7.6 Isolierung einzelsträngiger DNA von M13 38

8. DNA-Sequenzierung 39
8.1 Sequenzierung nach Maxam und Gilbert 39
8.2 Sequenzierung nach Sanger 40
8.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese 41
8.4 Sequenzierungsstrategie im Bakteriophagen P7 42

9. Computeranalyse der DNA-Sequenzen 42

D Resultate 44

1. Die Wechselwirkung der Bakteriophagen P1, P7 und Mu mit der bakteriellen Zellwand 44
1.1 Die Wirtsbereichskontrolle im Phagen P7 44
1.1.1 Prinzipielle Unterschiede der invertierbaren Elemente von P1 und P7 44

1.1.2 Die Abhängigkeit des Wirtsbereichs des Phagen P7 von der Orientierung des C-Segments 52
1.2 Charakterisierung primärer und sekundärer Rezeptoren der Bakteriophagen P1, P7 und Mu 54
1.2.1 Die Rezeptoren für P1"C(+)" und P7"C(+)" 57
1.2.2 Die Rezeptoren für P1"C(-)" und P7"C(-)" 65
1.2.3 Der sekundäre Rezeptor für Mu*G(+)* 71
1.2.4 Der sekundäre Rezeptor für Mu*G(-)* Phagen 74

2. Strukturelle und funktionelle Analyse der Schwanzfasergene von P1, P7 und Mu 75
2.1 Die Rezeptorbindungsstellen von Mu, P1 und P7 79
2.1.1 Austausch der Rezeptorbindungseigenschaften in Mu/P1 Hybridphagen. 79
2.1.2 Die Rolle der Gene *tfs* und *tfs'* von P1 bzw. *U* und *U'* von Mu für den Wirtsbereich der Phagen 85
2.1.3 Eigenschaften von Hybridphagen 91
2.1.3.1 Der COOH-Terminus von Gen *19* enthält die Rezeptorspezifität 93
2.1.3.2 Der Austausch von NH_2-Terminus und IR des Schwanzfasergens beeinträchtigt die Rezeptorbindung nicht 99
2.1.3.3 Hybride zwischen den Genen *19* und *19'* sind defekt 102
2.2 Linkerinsertionen und ihr Einfluß auf die Infektivität der Phagen 104
2.2.1 Der NH_2-Terminus im konstanten Teil von Gen *19* ist flexibel 108
2.2.2 Die Flexibilität des variablen Teils der Schwanzfaser ist abhängig vom Abstand zum COOH-Terminus 110
2.2.3 Nur der COOH-Terminus von *tfs* ist flexibel 115
2.3 Der Mittelteil des Schwanzfasergens *19* von P1 und P7 ist entbehrlich 117

3. Die Inversionsfunktion *cin* des Phagen P7 im Vergleich mit P1 120

E Diskussion 135

F Literatur 140

G Abkürzungen 149

A Zusammenfassung

Die Bakteriophagen P1, P7 und Mu tragen in ihrem Genom die homologen invertierbaren DNA-Segmente C bzw. G, deren Orientierung den Wirtsbereich dieser Phagen durch alternierende Expression von Genen bestimmt, die am Aufbau der Schwanzfasermoleküle beteiligt sind. Das Adsorptionsverhalten der Phagen an die Lipopolysaccharid(LPS)-Strukturen der bakteriellen Zellwand wurde auf definierten Rezeptormutanten abhängig von der (+) oder (-) Orientierung dieser Segmente untersucht, wobei primäre und sekundäre Rezeptoren näher charakterisiert werden konnten. Hierbei erwiesen sich die sekundären Rezeptoren für Mu*G(+)*, Glucose in α1-3 oder β1-3 glycosidischer Bindung, als identisch mit den primären Rezeptoren für P1. Mit Hilfe definierter Phagenmutanten wurde eine Analyse der Struktur-Funktions-Beziehung der Schwanzfasergene von P1, P7 und Mu durchgeführt. Durch den gezielten wechselseitigen Austausch der Rezeptorspezifitäten dieser Phagen konnten die LPS-Bindungsstellen mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb der COOH-terminalen 100 Aminosäuren der Gene *S* bzw. *19* lokalisiert werden. Diesen Genprodukten kann daher die Rolle der primären Schwanzfaserproteine zugeordnet werden. Ein Einfluß anderer Domänen dieser Proteine auf die Spezifität der Rezeptorbindung wurde nicht beobachtet.

Linkerinsertionen, die in Gen *19* von P1 und P7 konstruiert wurden, führen nicht notwendigerweise zu nichtinfektiösen Phagenpartikeln. Während sich der NH_2-Terminus und die "inverted repeat" (IR) Region als relativ flexibel erwiesen, zeigte der COOH-Terminus der Schwanzfaser eine hohe Empfindlichkeit gegenüber derartigen Insertionen. Eine Deletion in Gen *19* von P7, die dessen Schwanzfaser ungefähr auf die Länge der Faser des Phagen Mu verkürzt, war nicht in der Lage, Adsorption und Infektion des Phagen vollständig zu verhindern. Die Eigenschaften dieser Mutanten legen nahe,

daß die Schwanzfaser aus mehreren gleichartigen Untereinheiten aufgebaut sein könnte, deren Oligomerisierung am COOH-Terminus beginnt.
Die Gene *U* und *tfs*, die sich ebenfalls innerhalb der invertierbaren Segmente von Mu bzw. P1 und P7 befinden, sind in allen drei Phagen am Aufbau des Schwanzfaserkomplexes beteiligt und können einander komplementieren. Die genaue Funktion dieser Gene konnte nicht bestimmt werden, ein Einfluß auf den Wirtsbereich der Phagen ließ sich jedoch weitgehend ausschließen. Naheliegend ist dagegen eine katalytische Funktion bei der Oligomerisierung der Schwanzfasermoleküle.
Die Nukleotidsequenz der Rekombinationsfunktion *cin* des Phagen P7, die die Inversion des C-Segments katalysiert, zeigte nur geringfügige Unterschiede im Vergleich mit *cin* von P1, eine größere Divergenz findet sich jedoch in der 5' upstream Sequenz beider Gene. In dieser Region wurden sowohl in P7 als auch in P1 unterschiedliche palindromartige Sequenzen identifiziert, die möglicherweise die Erkennungsstellen für ein regulatorisches Protein unbekannter Funktion und Herkunft darstellen.

B Einleitung

Der Bakteriophage P1, weithin bekannt wegen seiner Fähigkeit zur allgemeinen Transduktion in *E. Coli*, ist ein temperenter Phage mit einer doppelsträngigen, terminal redundanten und zirkulär permutierten DNA von ungefähr 90.000bp Länge (Ikeda und Tomizawa, 1969; Iida und Arber, 1979). Im Unterschied zu den meisten anderen Coli-Phagen ist die Prophagen DNA im lysogenen Zustand nicht in das Wirtschromosom integriert, sondern verhält sich wie ein Plasmid mit einer Kopienzahl gleich der des Wirtschromosoms (Ikeda and Tomizawa, 1969; Prentki et al., 1977; Austin et al., 1978). Der Bakteriophage P7, wegen seiner Ampicillin-Resistenz ursprünglich ⌀Amp genannt (Smith, 1972), zeigt eine enge Verwandtschaft mit P1, die in einer extensiven DNA-Homologie, gegenseitiger Komplementierbarkeit in vielen Funktionen und der Bildung lebensfähiger genetischer Rekombinanten zum Ausdruck kommt (Chesney und Scott, 1975; Walker und Walker, 1976; Wandersman und Yarmolinsky, 1977; Yun and Vapnek, 1977).
In den letzten Jahren erwies sich P1 als ergiebiges Modellsystem zum Studium sequenzspezifischer Rekombinationsmechanismen, da dieser Phage zwei voneinander unabhängige solche Systeme enthält. Die Funktion des ersten, des *cre-lox* Systems, liegt in der Cyclisierung der Phagen DNA nach ihrer Injektion in den Wirtsorganismus und der genauen Segregation der Prophagen DNA bei der Zellteilung (für Review s. Sternberg und Hoess, 1983). Das zweite sequenzspezifische Rekombinationssystem, dessen physiologische Bedeutung in dieser Arbeit näher beleuchtet werden soll, ist für die Inversion des ca. 4.300bp langen C-Segments in der P1 DNA verantwortlich. Dieses Segment wurde erstmals in elektronenmikroskopischen Untersuchungen einzelsträngiger P1 DNA von Lee et al. (1974) als Stem-Loop Struktur beobachtet und als 620bp lange invertierte Sequenzwiederholung ("inverted repeat", IR) flankierend eine 3.000bp lange sog.

"C-Loop" DNA interpretiert. Heteroduplex-Untersuchungen zeigten bald darauf, daß diese "C-Loop" DNA mit dem 3.000bp langen G-Segment des Bakteriophagen Mu identisch war (Chow and Bukhari, 1976), wobei dieses Segment jedoch lediglich von 34bp langen IRs eingerahmt wird (Hsu und Davidson, 1974; Kahmann und Kamp, 1987). Auch in D108, einem zu Mu großenteils homologen Phagen, und in P7 wurden nachfolgend derartige invertierbare Segmente gefunden (Hull et al., 1978; Yun und Vapnek, 1977), wobei Hetroduplex-Untersuchungen zwischen P1 und P7 eine ungefähr 300bp lange Deletion oder Substitution in einem der IRs von P7 nachwiesen (Chow et al., 1978).

Die Inversion von G- und C-Segment erfolgt unter der Einwirkung der sequenzspezifischen Rekombinationsfunktionen *gin* bzw. *cin*. Beide Funktionen liegen benachbart zu ihrem invertierbaren Segment, jedoch unterscheidet sie ihre relative Orientierung bezüglich dieses Segments (Kamp et al. 1978; Plasterk und van de Putte, 1983; Hiestand-Nauer und Iida, 1983; Ritthaler, 1983). Die Rekombination, die zur Inversion führt, erfolgt sowohl in Mu als auch in P1 innerhalb der IRs, wobei sich die Rekombinationsstellen *cix* in P1 an den äußeren Enden der langen IRs befinden (Hsu und Davidson, 1974; Plasterk und van de Putte, 1983; Kahmann und Kamp, unpubl.; Iida et al., 1982; Ritthaler, 1983).

Die biologische Bedeutung der G-Segment Inversion in Mu wurde klar, als festgestellt wurde, daß die Orientierung des G-Segments die Infektivität der Phagen beeinflußt (Kamp et al., 1978). Phagen in einer Orientierung, definiert als G(+), sind infektiös für *E. Coli* K12, Phagen in G(-) Orientierung wachsen auf *E. Coli* C, *Enterobacter Cloacae, Citrobacter freundii, Shigella sonnei, Serratia marcescens* und einigen Stämmen von *Erwinia* (Kamp et al., 1978; Bukhari und Ambrosio, 1978; Symonds und Coelho, 1978; van de Putte et al., 1980; Kamp 1981; Faelen et al., 1981; Kamp und Sandulache, 1983). Die Adsorptionseigenschaften des Phagen werden durch zwei Paare von Genen, *S* und *U* bzw. *S'* und *U'*

bestimmt, die sich ganz oder teilweise innerhalb des G-Segments befinden und abhängig von der Orientierung des Segments abwechselnd exprimiert werden. Auch die Lokalisierung von Hostrange-Mutanten innerhalb dieses Segments zeigte, daß diese Gene am Aufbau der Schwanzfaser des Phagen beteiligt sind (Howe et al., 1979; van de Putte et al., 1980; Giphart-Gassler et al., 1982; Grundy und Howe, 1984; Kamp et al., 1984). Eine Sequenzanalyse des G-Segments und der benachbarten α- und β-Region von Mu zeigte, daß *S* und *S'* eine ungefähr 500bp lange Sequenz außerhalb von G in der α-Region gemeinsam haben (Kahmann und Kamp, 1987), die Inversion also die Fusion eines variablen COOH-Terminus innerhalb des G-Segments (S_V bzw. S'_V) an einen konstanten NH_2-Terminus (S_C) bewirkt (Abb. 1). Da Rekombination zwischen dem G-Segment von Mu und der entsprechenden Region innerhalb des C-Segments von P1, den einzigen Bereichen nennenswerter Homologie zwischen den beiden Phagen, zu einer Übertragung des breiteren Wirtsbereichs von P1 auf Mu und umgekehrt führt (Toussaint et al., 1978) mußte für das C-Segment von P1 eine ähnliche Funktion wie für das G-Segment angenommen werden. Diese Annahme wurde durch nachfolgende genetische Experimente und durch die Sequenzierung des C-Segments und seiner benachbarten Regionen, die einen dem Phagen Mu entsprechenden Aufbau dieses Segments signalisierten, bestärkt, wobei jedoch die hypothetischen Schwanzfasergene *19* und *19'* von P1 ungefähr die doppelte Länge der Gene *S* bzw. *S'* von Mu aufweisen (Abb. 1; Iida et al., 1982; Ritthaler, 1983; Walker und Walker, 1983; Sengstag und Arber, 1983; Iida, 1984; Kardas, 1984; Kamp et al., 1984;).

Ähnliche sequenzspezifische Inversionssysteme wurden in anderen Organismen gefunden. In *Salmonella typhimurium* reguliert die Rekombinationsfunktion *hin* die flagellare Phasenvariation durch Inversion eines einen Promotor enthaltenden DNA-Segments, so daß je nach Lage des Promotors das *H2* Flagellin Gen entweder aktiviert oder inaktiviert

wird. Die Inversionsfunktion befindet sich in diesem Fall selbst auf diesem Segment (Zieg und Simon, 1980). Die *pin* Funktion in *E. Coli* steht in Verbindung mit dem kryptischen Prophagen e14 und bewirkt die Inversion des 1794bp langen P-Segments. Die biologische Bedeutung dieser Inversionsreaktion ist nicht bekannt (Plasterk und van de Putte, 1983; van de Putte et al., 1984; Plasterk und van de Putte, 1985). Alle beschriebenen Inversionsfunktionen zeigen auf Proteinebene eine Homologie von größer 60% und sind hinreichend ähnlich, um sich gegenseitig komplementieren zu können (Chow et al., 1978; Kutsukake und Iino, 1979; Kamp und Kahmann, 1981; Ritthaler, 1983; Hiestand-Nauer und Iida, 1983; Plasterk und van de Putte, 1983; Kamp et al., 1984). Dies beweist ihre Zugehörigkeit zu einer einzigen Familie. Signifikante Homologie dieser Inversionsfunktionen findet sich auch mit einer zweiten Gruppe von Rekombinationsenzymen, den Resolvase-Funktionen der der Tn3 Familie angehörigen transponierbaren Elemente (Simon et al., 1980; Kamp et al., 1984). Die Resolvase bewirkt in einer sequenzspezifischen Reaktion die Auflösung von Cointegratstrukturen, die bei dem Transpositionsvorgang gebildet werden (für Review s. Grindley und Reed, 1985). Trotz der Homologie sind Resolvasen und Invertasen jedoch nicht wechselseitig austauschbar (Simon et al., 1980). Dies führt zu der Annahme, daß zwar beide Arten von Rekombinationsfunktionen von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, jedoch im Laufe der Evolution divergierten.

Die Infektivität eines Phagen hängt zunächst von dessen Fähigkeit ab, sich an die bakterielle Zellwand anzuheften. Als Anheftungsstellen oder Rezeptoren können hierbei grundsätzlich alle an der Oberfläche exponierten Strukturen dienen. Die Rezeptoren gramnegativer Bakterien befinden sich in deren äußerer Membran, einer von drei wesentlichen Schichten, die am Aufbau der bakteriellen Zellhülle beteiligt sind (für Review s. Lugtenberg und van Alphen,

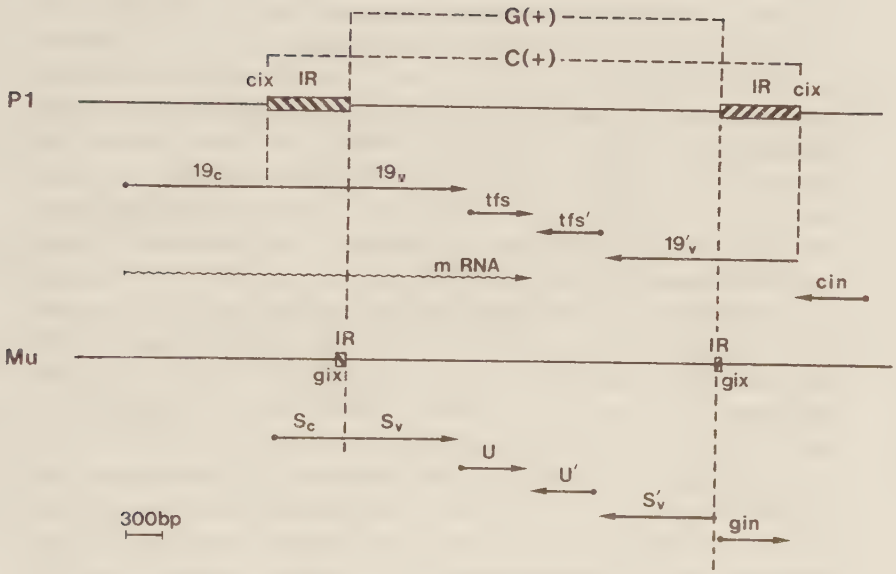


Abb. 1. Struktur der Inversionssysteme der Bakteriophagen P1 und Mu. Cix und Gix kennzeichnen die Crossover-Stellen für die Rekombination in den IRs. Konstante und variable Bereiche der Schwanzfasergene 19 und S sind durch c bzw. v angezeigt. tfs und tfs' (tail fiber specificity) stellen die zu U und U' von Mu analogen hypothetischen Gene in P1 dar.

1983). Die äußere Membran, die über ein Lipoprotein kovalent an die die innere cytoplasmatische Membran umgebende Peptidoglycanschicht gebunden ist, besteht aus einem Komplex von Lipopolysaccharid (LPS), Protein und Phospholipid. LPS wie Proteine der äußeren Membran können, häufig unter Zusammenwirkung, als Phagenrezeptoren dienen (für Reviews s. Lindberg, 1973 und 1977; Wright et al., 1980; Mäkelä und Stocker, 1984). Das LPS setzt sich aus dem hydrophoben Lipid A, das das Molekül in der äußeren Membran verankert, und aus einem exponierten hydrophilen, oft verzweigtkettigen Polysaccharid zusammen. Der hydrophile Teil besteht aus zwei Domänen, dem O-Antigen und der Core-Region, die beide als Rezeptoren fungieren können. Das O-Antigen besteht aus 20-50 Wiederholungseinheiten von vier bis fünf unterschiedlichen Zuckerresten, während die Core-Region aus einem einzigen, innerhalb der gramnegativen Bakterien relativ invarianten Oligosaccharid besteht (Mäkelä und Stocker, 1984). Mutanten, die das O-Antigen verloren haben, werden leicht isoliert, da das Wachstum solcher Mutanten nicht beeinträchtigt ist; so enthält der gängige Laborstamm *E. Coli* K12 kein erkennbares O-Antigen.

Bakteriophagen mit kontraktilen Schwänzen, zu denen auch Mu, P1 und P7 gehören, heften sich mit ihren Schwanzfasern an die bakteriellen Rezeptoren. Als Beweis hierfür dienen Veränderungen des Wirtsbereichs, als deren Ursache z. B. in den Phagen λ, K3 oder T4 häufig Mutationen in den Spitzen der Schwanzfasergene ausgemacht werden konnten (Shaw et al., 1977; Riede et al., 1987b; Goldberg, 1983). Das am besten untersuchte Beispiel dieser Phagen ist T4. Anhand einer anderen Klasse von Wirtsbereichsmutanten dieses Phagen, die eine Instabilität der Basisplatte aufweisen, wurde nachgewiesen, daß Adsorption und Infektion der Phagen sowohl von der Konzentration der Schwanzfaser- wie auch der Konzentration der Rezeptormoleküle abhängig ist (Wood und Henninger, 1969; Crawford und Goldberg, 1977). Die Bindung einer kritischen Anzahl von Schwanzfasern an die

Zelloberfläche ist notwendig, um über eine Konformationsänderung der Basisplatte die Kontraktion des Phagenschwanzes und somit die DNA-Ejektion zu bewirken (Arscott und Goldberg, 1976; Crawford und Goldberg, 1977). Mutanten mit einem Defekt in der Basisplatte benötigten für eine Infektion sowohl weniger LPS-Rezeptoren als Wildtyp Phagen (Crawford und Goldberg, 1977), als auch weniger Schwanzfasern (Crawford und Goldberg, wie zitiert in Wright et al., 1980).

Die Rezeptoren der Bakteriophagen Mu und P1 wurden in der Core-Region des LPS lokalisiert und zum Teil bereits charakterisiert (Kamp und Sandulache, 1983; Sandulache et al., 1984; Sandulache et al., 1985). Die unterschiedlichen Rezeptorspezifitäten der Phagen P1, P7 und Mu sollten nunmehr mit Hilfe bekannter bakterieller Rezeptormutanten genauer charakterisiert und hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten klassifiziert werden. Für den Phagen P7 mußten hierfür zunächst Mutanten in der Schwanzfaser konstruiert werden, um die Orientierungen des invertierbaren Segments mit der Infektivität des Phagen korrelieren zu können. Eine Sequenzanalyse in P7 sollte gleichzeitig mögliche Unterschiede zum Inversionssystem von P1 aufdecken. Die teilweise Homologie zwischen den Schwanzfasern von P1, P7 und Mu sollte es ermöglichen, die Rezeptorbindungsstellen der drei Phagen durch genetische Kreuzungen auszutauschen und dadurch ihre genaue Lage zu bestimmen. Hierfür war die Konstruktion von Mutanten Voraussetzung, mit deren Hilfe ein genau bestimmbarer Austausch von Gensegmenten erfolgen konnte. Durch eine gezielte Linker- und Deletionsmutagenese sollten schließlich Struktur und Funktion der am Aufbau der Schwanzfasern beteiligten Gene näher charakterisiert werden.

C Material und Methoden

1. Medien und Puffer

YT-Medium

8g Bacto Trypton
5g Hefeextrakt
5g NaCl
ad 1000ml H_2O

YT-Platten

wie YT-Medium, jedoch zusätzlich
15 g Bacto Agar

dYT-Medium

wie YT-Medium, jedoch die doppelte
Menge an Bacto Trypton und Hefeextrakt

M9CAA-Medium

100ml 10 x M9-Puffer
900ml H_2O
5g Vitamin Assay Casamino Acids
1ml Vitamin B1 (2mg/ml)
1ml 1M $MgCl_2$
25ml 20% Glucose (w/v)

10 x M9-Puffer

70g Na_2HPO_4 x $2H_2O$
30g KH_2PO_4
10g NH_4Cl
ad 1000ml H_2O

Falls erforderlich wurden den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin: 20mg/l
Chloramphenicol: 25mg/l
Kanamycin: 30mg/l
Streptomycin: 200mg/l
Tetracyclin: 20mg/l

NA - Weichagar

8g Nutrient Broth
5g NaCl
6,5g Bacto Agar
ad 1000ml H_2O

TM - Puffer

10mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)
10mM $MgSO_4$

TE - Puffer

10mM Tris-HCl, pH 7,4 oder 7,6 (25°C)
1mM EDTA

2. Verwendete Chemikalien und Enzyme

Antibiotika

Ampicillin (Sigma, München)
Chloramphenicol (Sigma, München)
Kanamycin-Sulfat (Serva, Heidelberg)
Streptomycin-Sulfat (Sigma, München)
Tetracyclin-Hydrochlorid (Boehringer, Mannheim)

Sonstige Chemikalien

Acrylamid (Biorad, Richmond USA)
Agarose Type II (Sigma, München)
Ammoniumpersulfat (Biorad, Richmond USA)
Bacto Agar (Difco, Detroit)
Bacto Trypton (Difco, Detroit)
Borsäure (Sigma, München)
5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-β-D-Galaktosid, X-Gal (Serva, Heidelberg)
Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)
CsCl (Baker Chemicals, Deventer NL)
Dichlordimetylsilan (Merck-Schuchard, Hohenbrunn)
Dimethylformamid, DMF (Baker Chemicals, Deventer NL)
Dithiothreit, DTT (Merck, Darmstadt)
Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg)
Ficoll 400 (Pharmacia)
Harnstoff (Biorad, Richmond USA)
Hefeextrakt (Difco, Detroit)
8-Hydroxychinolin p.a. (Merck, Darmstadt)
Isopropylthiogalaktosid, IPTG (Serva, Heidelberg)
Mercaptoethanol (Merck-Schuchard, Hohenbrunn)
Natriumdodecylsulfat, SDS (Serva, Heidelberg)
N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid (Biorad, Richmond USA)

N,N,N',N'-Tetramethläthylendiamin, TEMED (Biorad Richmond USA)
Nutrient Broth (Difco, Detroit)
Phenol p.a. (Merck, Darmstadt)
Polyethylenglykol 6000, PEG (Serva Heidelberg)
Silan GF31 (Wacker, München)
Thiamin-Hydrochlorid (Sigma, München)
Titriplex III, EDTA (Merck, Darmstadt)
Triton-X 100 (Serva, Heidelberg)
Trizma Base (Sigma, München oder Boehringer, Mannheim)
Trizma HCl (Sigma, München)
Vitamin Assay Casamino Acids (Difco, Detroit)
Xylencyanol FF (Serva, Heidelberg)

Verwendete Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer, Mannheim)
Lysozym (Boehringer, Mannheim)
DNA Polymerase I, Klenow Fragment (Boehringer, Mannheim)
DNase I (Sigma, München)
RNase A (Sigma, München)
RNase T_1 (Boehringer, Mannheim)
Terminale Transferase (Amersham, Braunschweig oder New England Nuclear)
T4 Polynukleotidkinase (Boehringer, Mannheim)
T4 DNA-Ligase (Boehringer, Mannheim)

Restriktionsendonukleasen:

AhaIII, BamHI, BglII, DraI, EcoRI, HaeIII, HindII, HindIII, HpaI, KpnI, PstI, PvuII, SphI, SspI, TaqI, (Boehringer, Mannheim)
BalI, AccI, MstI, NdeI, SalI, SnaBI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)

3. Bakterienstämme und Bakteriophagen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsstämme der Bakterien und Bakteriophagen sind in Tab. 1 dargestellt.

Tabelle 1

Bakterienstämme und Bakteriophagen

Stamm	relevante Eigenschaften	Herkunft oder Referenz
Bakterien		
E. Coli K12		
CSH50	*str, thi*$^-$, *pin*$^-$, P1^s	Miller (1972)
S1652	*str*, ^{s}*Δgal*, P1^s	Saedler (1967)
C600	Mu^s, P1^s	Appleyard (1954)
C600 Mu^r#4	Mu^r, P1^s	Sandulache et al. (1984)
C600 Mu^r#35	Mu^r, P1^s	Sandulache et al. (1984)
C600 Mu^r#38	Mu^r, P1^s	Sandulache et al. (1984)
C600 D108^r#10	Mu^r, P1^r	Sandulache et al. (1984)
71-18	F', *lacI*^{q}*Z*ΔM15	Yanisch-Perron et al. (1985)
JM83	ø80 *lacZ*ΔM15	Yanisch-Perron et al. (1985)
JM109	F', *lacI*^{q}*Z*ΔM15	Yanisch-Perron et al. (1985)
E. Coli C	MuG(-)h101^s, P1^s	Sammlung Freiburg
E. Coli C Mu^r#12	Mu^r, P1^r	Sandulache et al. (1985)
Enterobacter Cloacae	Indikator für MuG(-)	Hartmann und Goebel (1977)
Bakteriophagen		
P1*Cmc*ts100		Rosner (1972)
P7c1.9		Wandersman und Yarmolinsky (1977)
Muc*I*ts62		Chow et al. (1977)
Muc*I*ts62*gin*$^-$ 445-5 G(+)		Kamp et al. (1978)
Muc*I*ts62*gin*$^-$ 445-5 G(-)		Kamp et al. (1978)
Mu-249		Schmucker (1986)
Mu-116		Schmucker et al. (1986)
M13mp9		Messing und Vieira (1982)
St-1		Bradley (1970)

4. Plasmide und Plasmidkonstruktionen

4.1 Allgemein verwendete Plasmide

Als Clonierungsvektoren wurden die Plasmide pBR322 (Bolivar et al., 1977) und pUC8 (Vieira und Messing, 1982), sowie die RF-DNA des Phagen M13mp9 (Messing und Vieira, 1982) verwendet. Ausgangsmaterial für das bei der sequenzspezifischen Mutagenese benötigte Fragment mit dem Gen für Kanamycin-Resistenz war pUC-4K (Abb. 2; Vieira und Messing, 1982; Taylor und Rose, 1988). pGP5 und pGP6 (Kamp et al., 1984) dienten als Ausgangsplasmide für die Mutagenese von P1 (Abb. 3). pGP5 trägt ein Sau3AI-Fragment von P1 mit dem G-Segment und den angrenzenden 120bp der flankierenden IRs in der BamHI-Stelle von pBR322, dieselbe Schnittstelle enthält in pGP6 das BamHI-5 Fragment von P1 (Bächi und Arber, 1977) mit dem invertierbaren C-Segment und dem *cin* Gen. pGM1 enthält das G-Segment und das *gin* Gen des Phagen Mu (Kamp et al., 1978). Die Konstruktion weiterer im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide wird im Folgenden beschrieben.

4.2 Konstruktion von Plasmiden

4.2.1 Sequenzspezifische Mutagenese

Das Plasmid pUC-4K trägt das Gen für die Kanamycin-Resistenz aus dem Transposon Tn903 (Oka et al., 1981) zusammen mit einer Reihe künstlich eingeführter zusätzlicher Restriktionsschnittstellen, die symmetrisch zu beiden Seiten dieses Gens angeordnet sind (Abb. 2; Vieira und Messing, 1982; Taylor und Rose, 1988). Mit Hilfe entsprechender Restriktionsenzyme wurde das Resistenzgen aus pUC-4K isoliert und in passende Restriktionsstellen der zu mutagenisierenden Gene inseriert. Enthielten die Plasmide mit dem zu untersuchenden Gen neben der gewünschten Insertionsstelle weitere Schnittstellen für dasselbe Restriktionsenzym, so wurden Partialverdaus durchgeführt. Plasmide mit Insertionen wurden zunächst über ihre Kn-Resistenz selektioniert und anschließend durch Analyse mit Restriktionsenzymen kartiert. Zur Erzeugung der Linkerinsertionen wurde das Resistenzgen aus den Insertionsmutanten durch ein zweites Restriktionsenzym wieder ausgeschnitten. Die Anordnung der Restriktionsschnittstellen gewährleistet hierbei, daß immer Linker mit einer durch drei teilbaren Anzahl an Basenpaaren zurückbleiben, so daß keine Leserahmen zerstört werden. Eine solche Mutagenese ist in Abb. 2 am Beispiel der Plasmide pGP5-80 und pGP5-80/8 dargestellt. Die auf diese Weise erhaltenen Mutanten sowie die Position der Insertionen sind in Tabelle 2 aufgeführt; Insertionsmutanten mit dem Kn-Fragment sind in Abb. 3 dargestellt; eine genauere Beschreibung der entsprechenden Linkermutanten mit den zugehörigen Sequenzen findet sich in Abb. 18.

Abb. 2

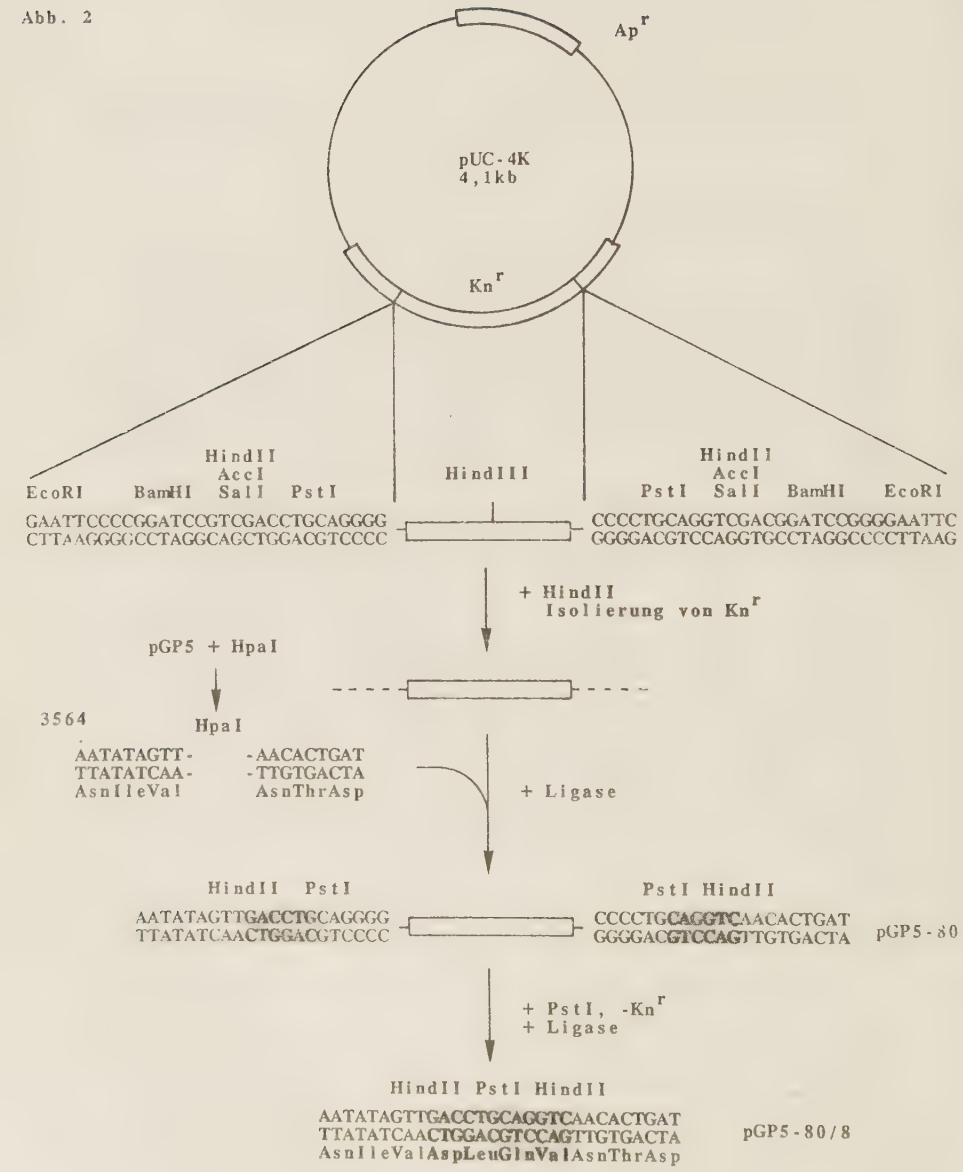


Abb. 2. Sequenzspezifische Insertionsmutagenese mit pUC-4K am Beispiel der Konstruktion von pGP5-80 und pGP5-80/8. Die aus pUC-4K stammende Sequenz in den Konstrukten wurde schattiert dargestellt.

Tabelle 2

Konstruktion von Insertionsmutanten

Mutante	I	II	III	IV	V	VI
pGP6-2		BglII	1754	BamHI	-	Kn^r
pGP6-2/28		BglII	1754	BamHI	SalI	L
pGP6-2/15	pGP6	BglII	1754	BamHI	PstI	L
pGP6-5		SnaBI	2082	HindII	-	Kn^r
pGP6-5/11		SnaBI	2082	HindII	PstI	L
pGP5-2		SnaBI	3310	HindII	-	Kn^r
pGP5-2/8		SnaBI	3310	HindII	PstI	L
pGP5-80		HpaI	3573	HindII	-	Kn^r
pGP5-80/8		HpaI	3573	HindII	PstI	L
pGP5-50		MstI	3746	HindII	-	Kn^r
pGP5-50/6		MstI	3746	HindII	PstI	L
pGP5-122		HaeIII	3924	HindII	-	Kn^r
pGP5-122/1	pGP5	HaeIII	3924	HindII	PstI	L
pGP5-9		SspI	4149	HindII	-	Kn^r
pGP5-9/2		SspI	4149	HindII	PstI	L
pGP5-108		BalI	4488	HindII	-	Kn^r
pGP5-108/12		BalI	4488	HindII	PstI	L
pGP5-21		PvuII	5042	HindII	-	Kn^r
pGP5-125		HaeIII	5120	HindII	-	Kn^r
pGP5-60		HpaI	5162	HindII	-	Kn^r
pGP5-11		SspI	6044	HindII	-	Kn^r
pWR1-15		TaqI	3085	AccI	-	Kn^r
pWR1-15/16	pWR1	TaqI	3085	AccI	PstI	L
pWR1-9		TaqI	6226	AccI	-	Kn^r
pWR2-13		EcoRI	1257	EcoRI	-	Kn^r
pWR2-13/41		EcoRI	1257	EcoRI	BamHI	L
pWR2-13/21		EcoRI	1257	EcoRI	SalI	L
pWR2-13/5		EcoRI	1257	EcoRI	PstI	L
pWR2-6	pWR2C(+)	DraI	3114	HindII	-	Kn^r
pWR2-6/4		DraI	3114	HindII	PstI	L
pWR2-22		DraI	3994	HindII	-	Kn^r
pWR2-22/1		DraI	3994	HindII	PstI	L
pWR2-34		HpaI	5162	HindII	-	Kn^r

I: Ausgangsplasmide für die Mutagenese
II: Restriktionsschnittstelle für die Insertion der Kn-Resistenz bzw. des Linkers im Plasmid
III: Position der Schnittstelle in der P1 bzw. P7 Sequenz (vgl. Abb. 5, 9, 12, 15); für die Nukleotid-Positionen der Insertionen in dem P7 Plasmid pWR2 wurden zum leichteren Vergleich die entsprechenden Positionen von P1 angegeben.
IV: Restriktionsenzym zur Präparation des Kn^r-Fragments aus pUC-4K
V: Restriktionsenzym zur Deletion des Kn^r-Fragments aus dem mutagenisierten Plasmid
VI: Art der Insertion (L: Linker; Kn^r: Gen für Kn-Resistenz). Zur Sequenz der Linker vgl. Abb. 18

4.2.2 Konstruktion von pWR1, pWR2, pWR2-3 und pWR2-34

Zur Konstruktion von pWR1 wurde das 7650bp lange BamHI-6 Fragment des Phagen P7, auf dem sich das invertierbare C-Segment befindet (Iida und Arber, 1979) in einem Shotgun-Experiment von BamHI-Fragmenten von P7 in die BamHI-Stelle von pBR322 cloniert. Aufgrund der Heteroduplex-Untersuchungen zwischen P1 und P7 (Yun und Vapnek, 1977) mußte davon ausgegangen werden, daß sich das Gen für die Inversionsfunktion Cin wie in P1 ebenfalls auf diesem Fragment befindet. Da diese Funktion auch auf Plasmiden exprimiert wird, konnten Clone mit BamHI-6 wegen ihrer *cin* Aktivität mit Hilfe eines biologischen Komplementationstests (siehe 5.6) isoliert werden (vgl. Abb. 3).

In pWR2 wurde das ca. 1350bp lange SphI-Fragment aus pWR1 deletiert, das das *cin*-Gen auf dem P7 Fragment und pBR322 überlappt. Dadurch verliert das Plasmid seine *cin* Aktivität. Ausgehend von pWR1, in dem das C-Segments wegen der *cin*-Aktivität in beiden möglichen Orientierungen vorliegen kann, erhält man bei der Konstruktion zwei Typen von Plasmiden, in denen das C-Segment entweder in C(+) oder C(-) Orientierung fixiert ist (pWR2C(+) und pWR2C(-)). Die Orientierung des C-Segments wurde durch Restriktionsverdau mit HindII bestimmt. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde ausschließlich pWR2C(+) verwendet (Abb. 3).

In pWR2-3 wurde das 606bp lange HindII-Fragment aus pWR2C(+), das den konstanten und variablen Teil des Schwanzfasergens überlappt, deletiert. pWR2C(+) wurde hierfür mit HindII partiell verdaut und die fragmentierte DNA religiert. Ap^r Clone wurden selektioniert und die Plasmid DNA durch Verdau mit HindII im Vergleich mit pWR2C(+) auf den Verlust des 606bp langen HindII-Fragments getestet. Das isolierte Plasmid, pWR2-3, besitzt nurmehr eine einzige HpaI-Schnittstelle, in die zur Konstruktion von pWR2-34 das Kn-Fragment aus pUC-4K inseriert wurde (Abb. 3).

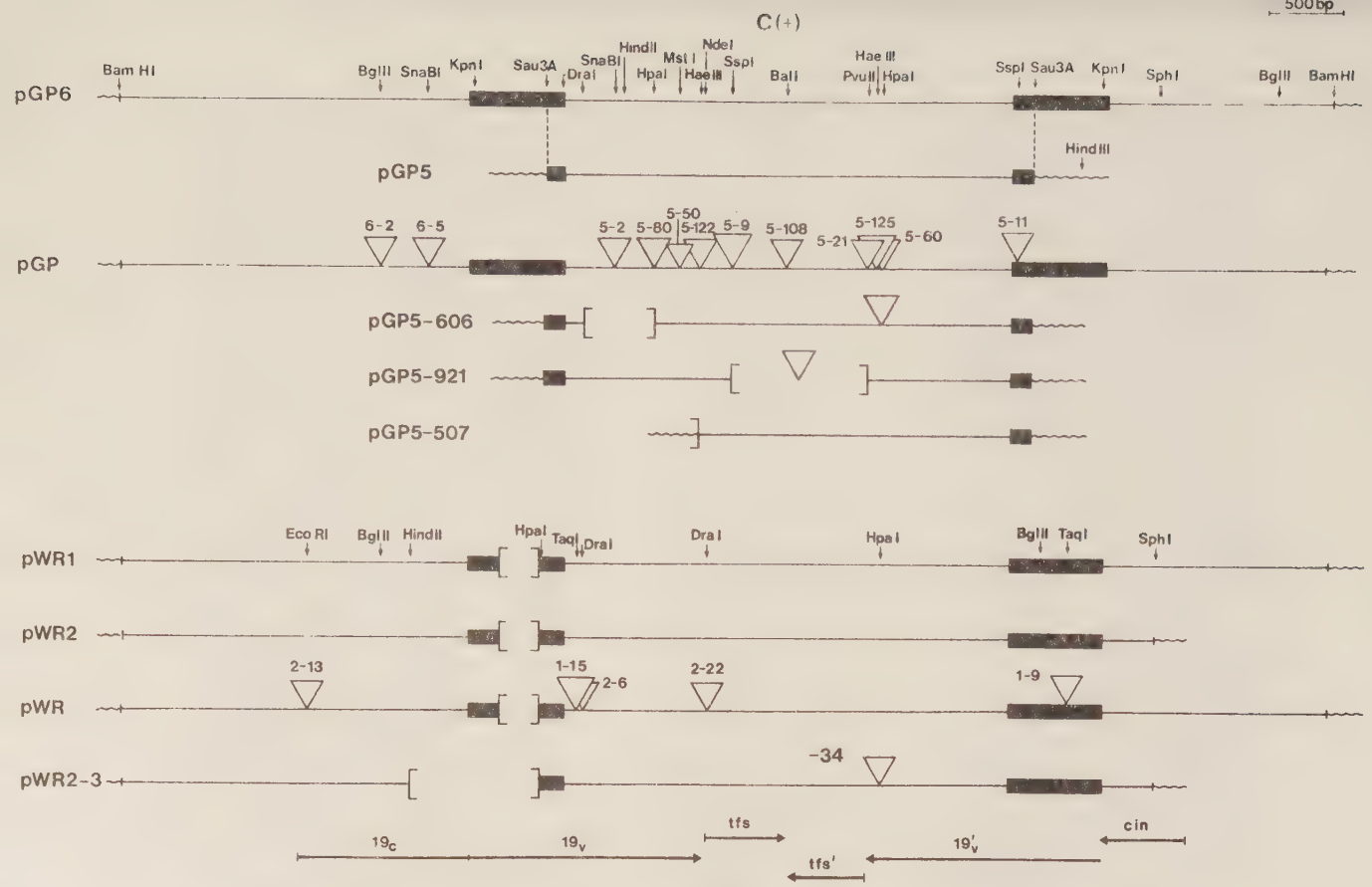


Abb. 3. Strukturen der wichtigsten P1 und P7 Plasmide und ihrer Mutanten. Wellenlinien symbolisieren die Vektor-DNA. Deletionen im Vergleich mit der DNA von P1 Wildtyp sind durch Klammern, Insertionen durch Dreiecke angezeigt. Dicke Balken stellen die IRs dar.

4.2.3 Konstruktion von pGP5-606

In pGP5-606 wurde im Vergleich zu pGP5-60 ein 399bp langes DraI/HpaI-Fragment im variablen Teil von Gen *19* deletiert (Abb. 3). Hierfür wurde pGP5-60 im ersten Schritt zunächst vollständig mit HpaI, anschließend partiell mit DraI verdaut. Selektion der religierten Plasmid-DNA auf Kn^r und Ap^r limitierte die Anzahl der möglichen Deletionsprodukte. Durch Restriktionsanalyse mit DraI und HindII wurde pGP5-606 als das Plasmid mit der gewünschten Deletion identifiziert.

4.2.4 Konstruktion von pGP5-507

Plasmid pGP5-50 wurde mit NdeI vollständig verdaut und anschließend religiert. Clone mit einer NdeI-Deletion sind Ap^rKn^s und besitzen von Gen *19* nur noch die letzten 25bp des COOH-Terminus (Abb. 3; vgl. Abb. 11).

4.2.5 Konstruktion von pGP5-921

Mit Hilfe von zwei HindIII-Schnittstellen, von denen sich eine in pBR322, die zweite innerhalb des Kn-Fragments befindet (Oka et al., 1981; Abb. 2 und 3), wurde das kurze HindIII-Fragment aus pGP5-9 durch das entsprechende Fragment aus pGP5-21 substituiert. Dies führt zu Plasmid pGP5-921, das im C-Segment eine 893bp lange Deletion zwischen dem SspI-Schnitt in *tfs* und dem PvuII-Schnitt in *tfs'* aufweist. Da sowohl pGP5-9 als auch pGP5-21 das Kn-Fragment in gleicher Orientierung bezüglich pBR322 tragen, wird bei dieser Konstruktion das Resistenzgen zwischen SspI- und PvuII-Schnitt restauriert (Abb. 3).

4.2.6 Konstruktion von pGP1-1/20 und pGP1-1/29

Beide Plasmide wurden ausgehend von dem P1 Plasmid pGP1-1 konstruiert. pGP1-1 trägt das BglII-5 Fragment von P1 (Bächi und Arber, 1977) mit dem C-Segment und dem benachbarten *cin* Gen, wobei letzteres durch eine Tn5-Insertion inaktiviert wurde (Ritthaler, 1983). In pGP1-1/20 wurde lediglich das Transposon Tn5 durch eine Deletion mit BamHI und BglII verkürzt, ohne daß hierbei die Kn-Resistenz zerstört wird. In pGP1-1/29 entfernt eine HpaI-Deletion den größten Teil des Transposons und des C-Segments. Dieses Plasmid hat die Kn-Resistenz verloren (vgl. Abb. 16).

5. Mikrobiologische und genetische Methoden

5.1 Konstruktion lysogener Bakterienstämme

5.1.1 Infektion auf Nährmedien

0,2ml des zu lysogenisierenden Bakterienstammes wurden mit 2,5 ml warmem NA-Weichagar gemischt und auf eine YT-Platte gegossen. Nach dem Erkalten wurde ein Tropfen eines Phagenlysats (ca 25µl) auf die Platte gegeben und über Nacht bei 32°C inkubiert. Durch einen Bakterienausstrich auf YT- oder selektive Antibiotika-Platten wurden aus dem Lysisbereich Einzelkolonien isoliert und diese auf Lysogenie getestet. Lysogenie wurde durch die vom Phagen vermittelten Antibiotikaresistenzen und durch die Hitzesensitivität der Kolonien bei 42°C und die Produktion infektiöser Phagenpartikel nachgewiesen.

5.1.2 Infektion in Flüssigkultur

0,2ml einer frischen Kultur des zu lysogenisierenden Stammes wurden zusammen mit 0,1ml eines Lysats zunächst 15min bei Raumtemperatur zur Präadsorption, dann 10min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2ml dYT-Medium wurde die Kultur mindestens 1h bei 32°C im Wasserbad geschüttelt und anschließend wurden Verdünnungen des Ansatzes auf geeignete Antibiotika-Platten gegeben und bei 32°C über Nacht inkubiert. Die Lysogenie resistenter Kolonien wurde wie oben beschrieben nachgewiesen.

5.2 Transformation von *E. Coli* mit Plasmid-DNA

Der Transformation mit Plasmid-DNA liegen die von Mandel und Higa (1970) und Cohen et al. (1972) beschriebenen Methoden zugrunde. Zur Präparation kompetenter Zellen wurden 20ml dYT-Medium mit 0.5ml einer frischen Bakterienkultur angeimpft und bei 32°C (lysogene Stämme) oder 37°C bis zu einer Lichtundurchlässigkeit von 70 AE (Klett-Summerson Colorimeter, 578nm) wachsen gelassen. Nach dem Abzentrifugieren (0°C, 15min, 5000rpm, Christ-Zentrifuge) wurden die Zellen in 10ml TM resuspendiert, wie oben zentrifugiert und in 10ml eiskalter 0,05M $CaCl_2$-Lösung resuspendiert. Nach 30min bei 0°C wurden die Zellen wiederum abzentrifugiert (10min, 5000rpm, 0°C) und erneut in 1ml 0,05M $CaCl_2$ aufgenommen. Für eine längere Aufbewahrung der kompetenten Zellen bei -70°C erfolgte die Resuspension in 1ml 0,05M $CaCl_2$-Lösung, die 10% Glycerin enthielt.
Zur Transformation wurden 0,2ml der kompetenten Zellen zusammen mit 0,5-1µg der zu transformierenden DNA in ein vorgekühltes Röhrchen gegeben. Nach 40min bei 0°C wurde der Ansatz 4min auf 37°C (lysogene Stämme) bzw. 42°C erhitzt, danach 10min im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 1ml dYT-Medium wurden die Zellen bei geeigneter Temperatur

0.5-1h wachsen gelassen und die Transformanten anschließend nach geeigneten genetischen Markern selektioniert.

5.3 Transfektion mit M13 DNA

Als Rezipientenstamm für die Transfektion mit M13 DNA dienten *E. Coli* K 12 71-18 oder JM109. 50ml dYT wurden mit 1ml frischer Kultur des jeweiligen Stammes angeimpft und 90min bei 37°C wachsen gelassen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (6000rpm, 0°C, 10min) und in 20ml 100mM $CaCl_2$ resuspendiert. Die Zentrifugation wurde noch zweimal wie oben wiederholt, wobei die Zellen zunächst in 10ml und schließlich in 2ml 100mM $CaCl_2$ aufgenommen wurden. Nach 6h bei 0°C wurden 0,2ml der nunmehr kompetenten Zellen zur Phagen-DNA (RF-Form; 0,5-1µg) pipettiert. Die Mischung wurde zunächst 90min in Eis gehalten, dann 3min bei 45°C inkubiert und anschließend weitere 10min bei 0°C gekühlt. 20µl eines solchen Ansatzes wurden zusammen mit 0,2ml Wirtszellkultur, 40µl 100mM IPTG und 40µl X-Gal-Lösung (2% X-Gal in Dimethylformamid) in 2,5ml NA-Weichagar ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Rekombinante M13-Phagen können als farblose Plaques von den blauen Plaques des Ursprungsphagen unterschieden werden.

5.4 Kreuzungsexperimente

Für alle Kreuzungen zwischen Plasmiden und Phagen wurden die Plasmidstämme entweder mit den Phagen lysogenisiert oder Lysogene mit den Plasmiden transformiert. Lysate aus solchen Stämmen, die die rekombinanten Phagen enthalten, wurden anschließend verwendet, um *E. Coli* K12 CSH50 oder S1652 zu infizieren oder zu lysogenisieren. Die rekombinanten Phagen, die bei einer Kreuzung der Kn-Resistenz aus den Plasmiden in Mu*cI*62 oder in P1*Cmc*ts100 entstehen, wurden mittels ihrer

Fähigkeit zur Kn-Transduktion identifiziert, und die korrekte Insertion des Kn-Fragments innerhalb des Genoms wurde durch Restriktionsanalyse bestätigt. Die Kreuzung der Kn-Resistenz in die Phagen ist auch dann möglich, wenn durch die Insertion defekte Phagenpartikel erzeugt werden, da diese durch die im Lysat vorhandenen Wildtyp Phagen komplementiert werden und dadurch phenotypisch als infektiöse Phagenpartikel erscheinen.
Bei Experimenten, in denen Gensegmente der Phagen Mu, P1 und P7 gegeneinander ausgetauscht werden sollten, wurden durch Insertionen oder Deletionen defekte Phagen gegen Plasmide mit entsprechenden intakten Gensequenzen gekreuzt. Rekombinante Phagen konnten dann als Plaquebildner auf geeigneten Indikatorstämmen selektioniert werden. Auf gleiche Weise wurde ein Rescue der wegen der Kn-Insertionen defekten Schwanzfasergene durch die entsprechenden Linkermutanten nachgewiesen (vgl. Resultate, 2.2). Die Linkermutanten pGP5-80/8, pGP5-122/1 und pGP5-9/2, die bei der Kreuzung gegen die entsprechenden Phagen mit Kn-Insertionen keine plaquebildenden Rekombinanten liefern, wurden in P1*Cm*#5-11 (vgl. Abb. 9) gekreuzt. Hierfür wurde die Fähigkeit von P1 ausgenutzt, das Plasmid mit der Linkermutation mittels eines Cointegrats zu mobilisieren und dadurch dessen Ap^r zu transduzieren. Die Bildung des Cointegrats erfolgt durch die Rekombination zwischen homologen Sequenzen von Plasmid und Phagen. Der Phage kann das Plasmid auf gleiche Weise wieder verlieren, wobei die Auflösung des Cointegrats jedoch so erfolgen kann, daß ein Teil der Phagen hierbei die Linkerinsertion behält, während im Plasmid das Wildtyp Gen restauriert wird. Für solche Kreuzungen wurden zunächst Lysogene von CSH50 mit P1*Cm*#5-11 und den drei Plasmidmutanten konstruiert. Anschließend wurde CSH50 mit Lysaten aus diesen Lysogenen wie in 5.1.2 beschrieben in Flüssigkultur infiziert und $Cm^rKn^rAp^r$ Kolonien selektioniert. Die Kolonien wurden mit TM-Puffer von der Platte gewaschen, eine Probe von 0,2ml in 5ml

frisches dYT-Medium überführt, die Kultur bei 32°C mit Cm und Kn bis zur Sättigung hochwachsen gelassen und eine Probe davon auf Cm-Platten ausgestrichen. Einzelkolonien wurden isoliert und auf Resistenz gegen Cm, Kn und Ap getestet. Sensitivität gegenüber Ap bedeutete, daß das Linkerplasmid bei Auflösung des Cointegrats verloren gegangen war. $Cm^rKn^rAp^s$ Kolonien wurden dann auf Produktion infektiöser Phagenpartikel untersucht, die DNA nichtinfektiöser Phagen wurde isoliert und die Linkerinsertion durch Restriktionsanalyse nachgewiesen.

5.5 Adsorptionstests

Die Adsorption von Testphagen an die Rezeptorstämme wurde in Form ihrer Lysogenisierungsrate gemessen. Von den zu testenden Phagen, die entweder Kn^r (Mu-116) oder Cm^rKn^r (P1 und P1/P7 Hybride) trugen, wurden kleine Lysate hergestellt, von denen ein Tropfen von 25µl auf einen Bakterienrasen des gewünschten Rezeptorstammes gegeben wurde. Nach Inkubation für wenigstens 18h bei 32°C wurde aus der Auftropfstelle eine Bakterienprobe entnommen und diese in 2,5ml dYT bei 32°C bis zur Sättigung wachsen gelassen. Verdünnungsreihen solcher Kulturen wurden auf geeignete Antibiotika-Platten gegeben und bei 32°C über Nacht inkubiert. Lysogenisierung der Bakterienstämme zeigte sich durch die von den Phagen vermittelten Antibiotika-Resistenzen und die Hitzesensitivität und Phagenproduktion der resistenten Kolonien bei 42°C. Die Lysogenisierungsrate wurde als das Verhältnis Kn^r bzw. Cm^rKn^r Kolonien zur Gesamtzahl der Bakterien einer Kultur bestimmt. Lysogene der Rezeptormutanten C600 Mu^r#4, #35 und #38 wurden mit dem Einzelstrangphagen St-1 auf Reversion zum Wildtyp-LPS getestet, da St-1 zwar auf C600, nicht aber auf den Mutanten Plaques bildet.

5.6 Biologischer Test auf Gin-Aktivität

Dieser Test beruht auf der Beobachtung, daß auch Mu*G(-)gin*$^-$ Phagen mit geringer Frequenz Wirte für Mu*G(+)* zu infizieren vermögen. Kann die defekte Gin-Funktion von Mu*G(-)gin*$^-$ durch den Wirt komplementiert werden, so befinden sich in der Nachkommenschaft eines solchen Phagen auch Mu*G(+)* Phagenpartikel, die selbst weitere Zellen infizieren können und dann als Plaques sichtbar werden. Für diesen Test wird ein Tropfen eines Lysats von Mu*G(-)gin*$^-$ auf einen Bakterienrasen des auf Gin-Aktivität zu testenden Stammes gegeben und anschließend bei 42°C über Nacht inkubiert. Plaquebildung zeigt die Komplementation der Gin-Funktion durch den Wirtsstamm an.

6. Allgemeine Methoden im Umgang mit DNA

6.1 Fällung von DNA

DNA wurde nach Zugabe von 1M LiCl (Endkonzentration 0,4M) und des doppelten Volumens an absolutem Ethanol zur Probenlösung bei -70°C gefällt (mindestens 15-30min). Nach 15min Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut 10min zentrifugiert und das Pellet in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Die DNA wurde anschließend in einem für die weitere Behandlung geeigneten Puffer aufgenommen.

6.2 Phenolextraktion

Zur Reinigung der DNA von störenden Proteinen wurde die DNA-haltige Probenlösung ein- bis zweimal mit einem Volumenteil puffergesättigten Phenols, einmal mit einer Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:48:2) und schließlich zur Entfernung restlichen Phenols mit Chloroform/Isoamylalkohol (48:2) extrahiert, wobei nach jeder Extraktion kurz zentrifugiert wurde, um eine bessere Phasentrennung zu erreichen. Anschließend wurde die DNA wie beschrieben mit LiCl/EtOH gefällt.
Zur Herstellung des puffergesättigten Phenols wurden 460g Phenol mit 250ml 0,5M Tris-HCl - Puffer (pH 7,9) und 0,8g Hydroxychinolin gemischt. Die Phenolphase wurde abgetrennt und erneut mit 100ml obigen Puffers versetzt. Die so neutralisierte Lösung kann bei 4°C im Dunkeln längere Zeit stabil aufbewahrt werden.

6.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA-Molekülen durch Restriktionsenzyme erfolgte bei geeigneter Temperatur je nach Enzym in LS-, MS- oder HS-Puffer. Für einige Enzyme (BamHI, EcoRI, KpnI, PstI und SphI) wurden die von den Herstellern empfohlenen Puffer verwendet.
Für die Erzeugung der Insertions- und Deletionsmutanten waren zum Teil Partialverdaus erforderlich. In diesem Fall wurden 3µg der zu verdauenden Plasmide mit verschiedenen Verdünnungen der Restriktionsenzyme 30min bei geeigneter Temperatur inkubiert und die Enzyme anschließend sofort durch Erhitzen auf 70°C oder durch Phenolextraktion inaktiviert. Aliquote der Ansätze von jeweils 1µg wurden auf einem Agarosegel getestet und die für die weiteren Reaktionsschritte am besten geeigneten Präparationen ausgewählt.

Puffer für Verdaus mit Restriktionsenzymen

10 x LS (Niedrigsalz) - Puffer
0,1M Tris-HCl, pH 7,4 (25°C)
0,1M $MgSO_4$
0,01M Dithiothreit

10 x MS (Mittelsalz) - Puffer
0,1M Tris-HCl, pH 7,4 (25°C)
0,5M NaCl
0,1M $MgSO_4$
0,01M Dithiothreit

10 x HS (Hochsalz) - Puffer
0.5M Tris-HCl, pH 7,4 (25°C)
1M NaCl
0,1M $MgSO_4$

6.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese und Größenberechnung der Restriktionsfragmente

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in Agarose-Gelen geeigneter Konzentration entweder durch vertikale Gelelektrophorese nach der Methode von Sugden et al. (1975) oder durch horizontale Elektrophorese mit den Pharmacia Gel-Apparaturen GNA-100 oder GNA-200. Proben verdauter DNA wurden mit $^1/_5$ ihres Volumens an 6 x Auftrag-Puffer I oder II gemischt und auf die Agarose-Gele gegeben. Die Konzentration der Gele und die Elektrophoresebedingungen variierten und sind bei den einzelnen Experimenten jeweils im Detail aufgeführt. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad 10min lang angefärbt, anschließend die Banden im Gel durch

Anregung des interkalierten Farbstoffs mit kurzwelligem UV-Licht sichtbar gemacht und durch ein Orangefilter (Kodak Nr. 2, 306nm) mit Polaroidfilm 55P/N oder 57P/N fotographiert.

6 x Auftragpuffer I	6 x Auftragpuffer II
0,25% Bromphenolblau	0,25% Bromphenolblau
50% Saccharose	0,25% Xylencyanol
	15% Ficoll 400

10 x E (Elektrophorese) - Puffer

48,46g Tris
50ml 1M NaOH
3,73g EDTA
22ml Eisessig
ad 1000ml H_2O

Zur Berechnung der Größen der einzelnen DNA-Fragmente wurde ihre Wanderungsgeschwindigkeit in Agarosegelen näherungsweise als unabhängig von der Basenzusammensetzung angenommen. Zwischen dem Logarithmus der Anzahl der Basenpaare dieser Fragmente und ihrer relativen Beweglichkeit kann dann eine lineare Beziehung angenommen werden, aus der die Größe unbekannter Fragmente berechnet werden kann. Als Größenmarker dienten die HindIII-Fragmente des Phagen λ (Sanger et al., 1982) oder andere Fragmente bekannter Größe.

6.5 Elektroelution von DNA-Fragmenten

Um DNA aus Agarosegelen zurückzugewinnen, wurden die Banden aus den Gelen ausgeschnitten und in Dialyseschläuchen in 1xE-Puffer (6.4) bei 75mA 30-60min elektroeluiert. Durch Umpolung der Spannung für 15 sec wurde eine Adsorption der DNA an die Dialysemembran rückgängig gemacht. Die eluierte DNA wurde über eine Elu-Tip Säule (Schleicher und Schüll) nach den Angaben des Herstellers von Agaroseresten gereinigt und durch Fällung mit LiCl/EtOH konzentriert.

6.6 Dephosphorylierung von DNA

Die zu dephosphorylierende DNA wurde in 0,1ml Phosphatase-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8,5; 10mM NaCl) aufgenommen und mit 1 unit Alkalischer Phosphatase 30min bei 37°C (5' überhängende Enden) oder 30min bei 56°C (glatte oder 3' überhängende Enden) inkubiert. Zur Entfernung der Phosphatase wurde die Probe mit Phenol extrahiert und die DNA anschließend mit LiCl/EtOH gefällt und in einem geeigneten Puffer aufgenommen.

6.7 Ligierung von DNA-Fragmenten

Vor der Ligasereaktion wurden Restriktionsenzyme durch Erhitzen auf 70°C oder durch Phenolextraktion inaktiviert und die fragmentierte DNA mit Ethanol gefällt. Insert-DNA wurde gegebenenfalls in einem molaren Verhältnis von ungefähr 1:1 zugegeben. Die Ligierung erfolgte bei einem Volumen von 15 oder 20µl in einem Puffer von 50mM Tris-HCl; pH 7,4, 10mM $MgCl_2$ und 10mM DTT mit 3mM ATP bei 14-16°C über Nacht. Die Konzentration an T4-Ligase variierte mit der Art der zu ligierenden Enden und wurde nach den Angaben des Herstellers gewählt.

7. Phagen- und DNA-Präparation

7.1 Herstellung und Titerbestimmung von Phagenlysaten

Ein lysogener Bakterienstamm wurde in 10ml YT- oder dYT-Medium bei 32°C in einem Wasserbad-Schüttler bis zu einer Trübung von 70 bis 80 AE (Klett-Summerson Colorimeter, 578nm) wachsen gelassen und anschließend 15min bei 42°C inkubiert (P7*c*1.9 wurde für hochtitrige Lysate bei 45°C induziert). Die Bakterien wurden anschließend bei 37°C im Wasserbad so lange geschüttelt, bis die Lichtundurchlässigkeit ein Minimum erreicht hatte (ca 1,5h) und daraufhin mit 0,2ml Chloroform versetzt. Nach weiteren 5min bei 37°C im Wasserbad-Schüttler war die Lysis vervollständigt. Das Lysat wurde schnell im Eisbad abgekühlt und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (4°C, 15min, 5000rpm; Christ); die Phagen befinden sich im Überstand.
Von den zu testenden Lysaten wurden Verdünnungsreihen in TM hergestellt. 0,2ml einer geeigneten Indikatorkultur wurden mit 2,5ml warmem NA-Weichagar auf eine YT-Platte gegossen und nach dem Erkalten wurde von jeder Verdünnung ein Tropfen von 10µl auf die so präparierte Platte gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 42°C inkubiert und aus der Anzahl der Plaques auf dem Bakterienrasen wurde der Titer der Phagenlösung bestimmt.

7.2 Präparative Phagenisolierung

Große Phagen-Präparationen wurden mit geringfügigen Änderungen nach der bei Kahmann et al. (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. Die gewünschten Phagen wurden durch Hitzeinduktion eines geeigneten lysogenen Stammes präpariert. Dazu wurden 250ml dYT-Medium in einem 1l-Nasenkolben mit 2,5ml einer frischen Kultur angeimpft und bei 32°C bis zu einer Lichtundurchlässigkeit von 90-110 AE wachsen gelassen. Nach 20min Hitzeinduktion bei 42°C wurde der Kolben in einen Wasserbad-Schättler überführt und bei 37°C so lange inkubiert, bis die Lichtundurchlässigkeit ein Minimum erreicht hatte. Nach Zugabe von 0,5ml Chloroform wurde weitere 5min inkubiert und anschließend schnell auf Raumtemperatur abgekühlt. $MgSO_4$ (Endkonzentration 1mM) und DNase I und RNase A (Endkonzentration jeweils 1µg/ml) wurden hinzugefügt, und nach 20min bei Raumtemperatur wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (4°C, 30' 5000rpm; Sorvall RC-3B) und die Phagen aus dem Überstand mit PEG 6000 (Endkonzentration 10%) und NaCl (Endkonzentration 0,4M) gefällt. Nach der Präzipitation der Phagen (16h, 4°C) wurde der Niederschlag abzentrifugiert (10min, 5000rpm, 4°C, Sorvall) und in 5ml TM- oder SM-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde auf einen CsCl-Blockgradienten, bestehend aus CsCl-Lösungen in SM der Dichten 1,4, 1,5 und 1,6, gegeben und 3h bei 4°C und 31000rpm (SW 41, Beckman, Spinco) zentrifugiert. Die Phagen bilden eine deutlich sichtbare bläulich-weiße Bande. Nach Isolierung der Phagen dialysierte man zweimal je 1h gegen TM-Puffer (Bakteriophage Mu) oder gegen P1-Puffer (20mM Tris-HCl, 10mM $MgSO_4$, 1% NH_4-Acetat, pH 7,2; Walker und Anderson 1970).
Zur DNA-Präparation wurden der Phagenlösung zunächst SDS (Endkonzentration 1%) und anschließend ein gleiches Volumen puffergesättigten Phenols zugegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden die Phasen durch kurze Zentrifugation getrennt, und die Phenolphase, die das Phagenprotein

enthält, entfernt. Die Extraktion wurde wiederholt bis keine Interphase mehr sichtbar war (mindestens zweimal), und anschließend dialysierte man die wässrige Phase, die die Phagen-DNA enthielt, ausgiebig gegen TE-Puffer. Konzentration und Reinheit der DNA wurden durch Messung der UV-Absorption bei 260 und 280nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260nm entspricht einer DNA-Konzentration von ungefähr 50µg/ml.

SM - Puffer

20ml 1M Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)
20ml 25% NaCl (w/v)
1ml 1M $MgSO_4$
10ml 1% Gelatinelösung (w/v)
ad 1000ml H_2O

7.3 "Mini-Präparation" von Phagen-DNA

Eine schnelle Isolierung von Phagen-DNA, die für einen Verdau mit Restriktionsendonukleasen geeignet ist, wurde entsprechend der Methode, wie sie bei Maniatis et al. (1982) für den Bakteriophagen λ beschrieben wurde, für die Phagen P1, P7 und Mu entwickelt.
Aus einem lysogenen Bakterienstamm wurden wie unter 7.1 beschrieben kleine Lysate hergestellt. Nach dem Abzentrifugieren bei 12000g wurden dem Überstand $MgSO_4$ (Endkonzentration 1mM) sowie DNaseI und RNase A (Endkonzentration 1µg/ml) zugegeben. Nach 30min Inkubation bei 37°C wurde das gleiche Volumen einer 2M NaCl-Lösung enthaltend 20% ($^{w}/_{v}$) PEG 6000 hinzugefügt und über Nacht, mindestens jedoch 1h bei 4°C stehen gelassen. Die präzipitierten Phagen wurden

abzentrifugiert (10000g, 20min, 4°C) und in 0,5ml SM durch Vortexen resuspendiert. Nach abermaliger Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge (4min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfhütchen überführt und nach Zugabe von 5µl 10%iger SDS-Lösung und 5µl 0,5M EDTA (pH 8,0) bei 68°C 20min inkubiert. Die Probe wurde mit Phenol extrahiert und die Phagen-DNA aus dem wässrigen Überstand durch Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol gefällt (4°C, 20min). Nach dem Abzentrifugieren (4°C, 15min) wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100µl TE-Puffer (pH 7,6) aufgenommen. Pro Verdau wurden 10-15µl der Präparation eingesetzt.

7.4 Präparative Plasmidisolierung

Größere Plasmidpräparationen erfolgten nach der Methode von Stougaard und Molin (1981). Dazu wurden 250ml M9CAA-Medium in einem 1l-Nasenkolben mit 2,5ml einer frischen Bakterienkultur angeimpft und abhängig vom jeweiligen Stamm bei 32°C oder 37°C bis zu einer Lichtundurchlässigkeit von 80 AE (Klett-Summerson Colorimeter, 578nm) wachsen gelassen. Nach Zugabe von Cm zu einer Endkonzentration von 200µg/ml wurden die Kulturen weitere 15-20hs bei der entsprechenden Temperatur geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren (0°C, 10min, 5000rpm; Sorvall) wurde das Sediment in 1,5ml kaltem Sucrose-Tris-Puffer resuspendiert und das Volumen mit dem gleichen Puffer auf 2,5ml eingestellt. Zur Lysis der Zellen wurde die Bakteriensuspension mit 0,45ml einer frisch bereiteten wässrigen Lösung von Lysozym (5mg/ml) und RNase A (300µg/ml) gemischt und 5min bei 0°C inkubiert. Danach wurden 0,9ml Tris-EDTA-Puffer und nach weiteren 5min auf Eis 3,6ml Triton-Puffer hinzugefügt. Nach 10min Inkubation bei 0°C

wurde abzentrifugiert (4°C, 60min, 15000rpm; Sorvall) und das klare Lysat mit 4M NaCl- (Endkonzentration 0,5M) und 30%iger PEG-Lösung (Endkonzentration 10%) versetzt. Nach wenigstens 18h bei 4°C wurde der voluminöse weiße Niederschlag, der die Plasmid-DNA enthält, abzentrifugiert (4°C, 5min, 4000rpm; Sorvall) und das Sediment in 1ml TE-Puffer (ph 7,6) resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Beckman Quick Seal Röhrchen gefüllt, mit 4ml CsCl-Ethidiumbromid-Lösung unterschichtet und entweder 3-4h bei 55000rpm oder 12-18h bei 45000rpm in einem Vertikalrotor zentrifugiert (VTi 65, Kontron TGA 70 bzw. TGA 50), wobei bei längerer Zentrifugation eine bessere Trennung von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA erreicht wird. Die Bande der höchsten Dichte, die die superhelikale Plasmid-DNA enthält wurde isoliert. Die Entfernung des Ethidiumbromids erfolgte durch dreimalige Extraktion mit wasser- und CsCl-gesättigtem Isopropanol. Die Probe wurde anschließend 1h gegen TE-Puffer dialysiert, ein- bis zweimal mit puffergesättigtem Phenol extrahiert und erneut gegen TE-Puffer dialysiert (mehrfacher Pufferwechsel, einmal Dialyse über Nacht). DNA-Konzentration und Reinheit wurden durch Absorptionsmessung bei 260nm und 280nm am UV-Spektrophotometer bestimmt.

Puffer für die Plasmidpräparation

Saccharose-Tris - Puffer, pH 8,0
25% Saccharose (w/v)
0,05M Tris-HCl

Tris-EDTA - Puffer, pH 8,0
0,25M Tris-HCl
0,25M EDTA

Triton - Puffer, pH 8,0
0,05M Tris-HCl
0,01M EDTA
2% Triton-X 100 (w/v)

CsCl-Stammlösung für die Dichtegradienten-Zentrifugation im Vertikalrotor
80g CsCl
8ml Ethidiumbromid (Stammlösung 5mg/ml)
52ml TE-Puffer, pH 7,6

7.5 "Mini-Präparation" von Plasmiden

Eine rasche Extraktion von Plasmiden aus Bakterienzellen für Clonierungsexperimente, zur Transformation oder für ein schnelles Screening rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte mit einigen Modifikationen nach der Methode von Birnboim und Doly (1979). 1,5ml einer frischen, das zu untersuchende Plasmid enthaltenden Bakterienkultur wurden in einem 1,5ml Eppendorfhütchen 1min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,1ml Lösung A resuspendiert. 0,2ml frisch zubereiteter Lösung B wurden hinzugefügt und die Mischung 10min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,15ml eiskalter Lösung C wurde erneut 5min bei 4°C stehen gelassen. Der Niederschlag wurde durch abzentrifugiert (15min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das doppelte Volumen kalten absoluten Ethanols wurde zugegeben, 20min bei 4°C inkubiert und das gebildete Präzipitat durch Zentrifugation (15min) sedimentiert und in 0,2ml TE (pH 7,6) aufgenommen. Nach Zugabe von 0,1ml kalter 7,5M Ammonium-acetat-Lösung und Inkubation für 20min bei 4°C wurde die präzipitierte hochmolekulare RNA durch Zentrifugation

(15min; 12000g) entfernt und die Plasmid-DNA aus dem Überstand mit Ethanol gefällt. Der getrocknete Niederschlag wurde in 0,1ml Lösung D resuspendiert und zusammen mit 25 units RNase T_1 20min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe zur Entfernung der RNase mit Phenol extrahiert und die Plasmid-DNA erneut aus der wässrigen Phase gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 0,05 ml TE-Puffer (pH 7,6) aufgenommen. Für eine Transformation oder einen Verdau wurden jeweils 10-15µl eingesetzt. Diese Methode wurde auch zur Präparation doppelsträngiger M13-DNA (RF-Form) verwendet.

Lösung A: 25mM Tris-HCl (pH 8,0)
50mM EDTA
1% (w/v) Glucose

Lösung B: 0,2N NaOH
1% (w/v) SDS

Lösung C: 3M Kaliumacetat (pH 4,8)
(3M Kaliumacetat, 2M Essigsäure)

Lösung D: 10mM Tris-HCl (pH 7,6)
1mM EDTA
50mM NaCl

7.6 Isolierung einzelsträngiger DNA von M13

3ml dYT wurden mit 30µl einer frischen Kultur von *E. Coli* K12 71-18 oder JM109 angeimpft und 45min bei 37°C wachsen gelassen. Plaques von M13mp9 oder seiner Derivate wurden mit einer sterilen 100µl Mikropipette ausgestochen und zu dieser Kultur gegeben. Die Phagen wurden anschließend bei 37°C 5h vermehrt. 1,5ml der Kultur wurden sodann in ein Eppendorfgefäß überführt, die Wirtszellen 3min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand nochmals 5min zentrifugiert und davon 0,8ml in ein neues Eppendorfhütchen pipettiert. Nach Zugabe von 0,2ml 20%iger PEG-Lösung in 2,5M NaCl wurde 10min bei Raumtemperatur inkubiert, 5min zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Niederschlag wurde in 0,1ml TM-Puffer aufgenommen und zweimal mit 50µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Nach Entfernung restlichen Phenols durch Chloroform/Isoamylalkohol und Zugabe von 10µl 3M Na-Acetat-Lösung wurde die DNA mit Ethanol gefällt

8. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte entweder nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) oder nach Sanger et al. (1977).

8.1 Sequenzierung nach Maxam und Gilbert

Zur Sequenzierung nach Maxam und Gilbert wurde die geschnittene doppelsträngige DNA entweder am 5'- oder am 3'-Ende mit Polynukleotidkinase (PNK) bzw. Terminaler Transferase durch ^{32}P radioaktiv markiert. Zur Markierung am 5'-Ende wurde die DNA zunächst wie beschrieben dephosphoryliert und anschließend in 20µl H_2O resuspendiert. 5µl 10xPNK-Puffer I (5' überhängende Enden) oder II (glatte oder 3' überhängende Enden), 2,5µl 0,1M DTT-Lösung, 5µl [γ-^{32}P]ATP entsprechend 250µCi und 10 units PNK wurden hinzugefügt, und nachdem das Volumen auf 50µl eingestellt worden war, wurde der Reaktionsansatz 30min bei 37°C inkubiert. Die Mischung wurde anschließend mit Phenol extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt.

10 x PNK-Puffer I	10 x PNK-Puffer II
0,5M Tris-HCl, pH 7,5	0,7M Tris-Hcl, pH9,5
0,1M $MgCl_2$	0,1M $MgCl_2$
	30% Glycerin

Die 3'-Markierung der DNA erfolgte nach dem Protokoll der Firma Amersham mit dem Enzym Terminale Transferase und [α-^{32}P]Cordycepin oder [α-^{32}P]ddATP. Die Probe wurde wie oben durch Phenolextraktion und Ethanolfällung aufgearbeitet. Die an 5'- bzw. 3'-Enden markierte DNA wurde mit einem zweiten Restriktionsenzym nachgeschnitten und die Fragmente auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschten Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und wie oben beschrieben aus der Agarose elektroeluiert und über Elutip-Röhrchen gereinigt. Die chemischen Spaltungsreaktionen und die Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese wurden wie bei Maxam und Gilbert (1980) beschrieben durchgeführt. Die Auftrennung der Spaltstücke erfolgte auf 20%igen, 8%igen und 6%igen Polyacrylamid-Gelen.

8.2 Sequenzierung nach Sanger

Zur Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) wurden die zu sequenzierenden DNA-Fragmente in M13mp9 cloniert. Die Hybridisierung der einzelsträngigen DNA des Phagen mit einem Universal-Primer der Sequenz 5'-GTAAAAC-GAACGGCCAGT (Amersham) und die Markierung mit [α-^{35}S]dATP erfolgten nach dem Protokoll der Firma Amersham. Die markierten Fragmente wurden auf 8%igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt.

8.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung radioaktiv markierter DNA-Fragmente erfolgte auf 6%igen, 8%igen oder 20%igen Polyacrylamidgelen. Zur Herstellung der 8%igen und 6%igen Gele wurden Acrylamid und Bisacrylamid als 40%ige bzw. 2%ige Lösungen (w/v) eingesetzt.

Zusammensetzung der Gele:

	20%	8%	6%
Acrylamid	14,5g	15ml	11ml
Bisacrylamid	0,75g	15ml	11ml
Harnstoff	31,5g	31,5g	31,5g
10xTBE-Puffer	7,5ml	7,5ml	7,5ml
ad 75ml H_2O			

10 x TBE-Puffer (pH 8,3)

121,1g Tris
51,35g Borsäure
3,72g EDTA
ad 1000ml H_2O

Zur Polymerisierung wurde die Gellösung mit 0,5ml 10%iger Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und mit 30µl TEMED versetzt. Die Glasplatte, auf die das Gel polymerisiert werden sollte, wurde mit Silan GF 31, die zweite Platte mit Dichlordimethylsilan vorbehandelt. Die Gelmaße betrugen 20x40cm bei einer Schichtdicke von 0,2mm. Die Elektrophorese erfolgte in 1xTBE-Puffer bei 34 Watt. Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele mit Ausnahme des 20%igen Gels, das sofort mit

Klarsichtfolie überzogen und autoradiographiert wurde, 10min in 10%iger Essigsäure fixiert und bei 60°C mindestens 90min getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C auf Kodak-Film XR-5.

8.4 Sequenzierungsstrategie im Bakteriophagen P7

Die Kartierung von pWR1 erfolgte mit den Restriktionsenzymen AhaIII (DraI), BglII, EcoRI, HindII, HpaI, KpnI und SphI, wobei die bekannten Sequenzdaten aus P1 (Kardas, 1984; Sengstag et al., 1983; Hiestand-Nauer und Iida, 1983) aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen P1 und P7 als Anhaltspunkt dienten. Die Sequenzierung erfolgte entweder aus pWR1, der Insertionsmutante pWR1-40 oder nach Subclonierung einzelner Fragmente in pUC8 und M13mp9 aus pUC8-20, M13mp9-1 oder M13mp9-6. Das Sequenzierungsschema sowie die hierbei verwendeten Clone sind in Abb. 4 dargestellt.

9. Computeranalyse der DNA-Sequenzen

Die Analyse von DNA-Sequenzen wurde mit Hilfe der Programme der Genetics Computer Group der University of Wisconsin (UWGCG) durchgeführt. Für Sequenzvergleiche wurden die Programme BESTFIT und GAP, für die Suche nach intramolekularen Sequenzwiederholungen wurde das Programm REPEAT verwendet. STEMLOOP diente der Suche nach Palindrom-Strukturen. Strukturanalysen auf Proteinebene erfolgten nach der computerisierten Chou-Fasman Methode mit dem Programm PEPTIDESTRUCTURE (Chou und Fasman, 1978; Nishikawa, 1983); die graphische Darstellung der ermittelten Struktur erfolgte mit Hilfe des Programms PLOTSTRUCTURE.

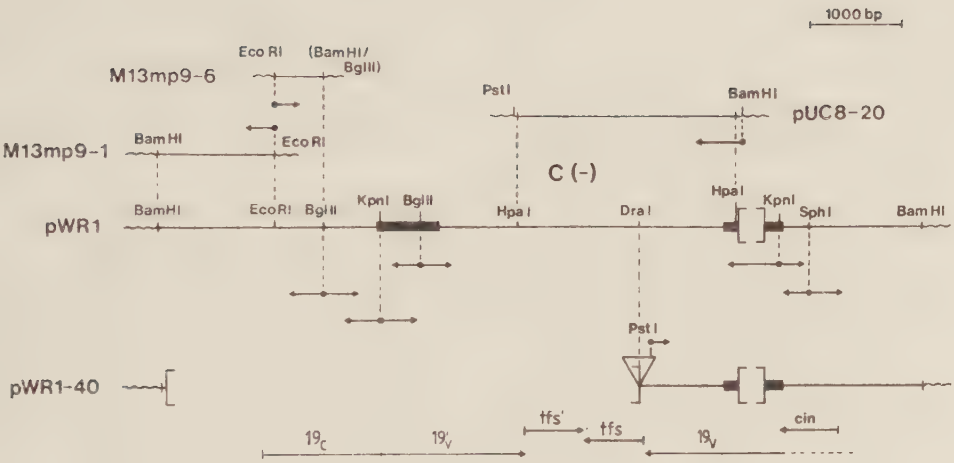


Abb. 4. Sequenzierungsstrategie im Bakteriophagen P7. P7 Sequenzen in den verschiedenen Clonen sind durch gerade Linien dargestellt. Schwarze Boxen kennzeichnen die IR-Sequenzen (vgl. Resultate, 1.1.1, Abb. 5a). Wellenlinien repräsentieren die Vektor-DNA. Die Sequenzierung von Fragmenten aus pWR1, pWR1-40 oder pUC8-20 erfolgte nach Maxam und Gilbert. Die Subclone M13mp9-1 und M13mp9-6 wurden nach Sanger sequenziert. pWR1-40 wurde bei einer sequenzspezifischen Mutagenese von pWR1 durch Partialverdau mit AhaIII und anschließender Ligierung mit dem durch HindII erzeugten Kn-Fragment aus pUC-4K erhalten. Die Kn-Insertion (∇) substituiert eine ca. 5kbp Deletion ([ ]) innerhalb von BamHI-6, die durch einen unspezifischen Strangbruch an einem und durch einen AhaIII(DraI)-Schnitt im NH_2-Terminus von tfs am anderen Ende begrenzt wird. Die Sequenzierung in pWR1-40 effolgte ausgehend von einem PstI-Schnitt innerhalb des inserierten Fragments.

D Resultate

1. Die Wechselwirkung der Bakteriophagen P1, P7 und Mu mit der bakteriellen Zellwand

Die Entdeckung, daß die Orientierung invertierbarer Elemente in den Bakteriophagen Mu und P1 den Wirtsbereich dieser Phagen kontrolliert, legte auch für das nachfolgend identifizierte homologe Segment des mit P1 eng verwandten Phagen P7 (Yun und Vapnek, 1977) eine entsprechende Funktion nahe. Um dies nachzuweisen und gleichzeitig eine Grundlage für die vergleichende Analyse der Rezeptorspezifitäten dieser Phagen zu schaffen, die die Voraussetzung für weitere Untersuchungen zum funktionellen Aufbau der Schwanzfasern dieser Phagen, z. B. der Lokalisierung der Rezeptorbindungsstellen, bildete, mußte zunächst wie für P1 und Mu auch für P7 die Infektivität des Phagen für bestimmte Wirtsstämme mit der Orientierung des invertierbaren Segments korreliert werden.

1.1 Die Wirtsbereichskontrolle im Phagen P7

1.1.1 Prinzipielle Unterschiede der invertierbaren Elemente von P1 und P7

Die hohe Homologie zwischen P1 und P7 und die Erkennung ähnlicher Rezeptoren, die sich in Plattierungs- und LPS-Inaktivierungsexperimenten zeigte (Sandulache et al., 1984), legten zwar für die entsprechenden Wirtsbereiche der beiden Phagen auch eine gleiche Orientierung des invertierbaren Segments nahe, jedoch zeigten elektronenmikroskopische Heteroduplexstudien zwischen P1 und P7 gerade

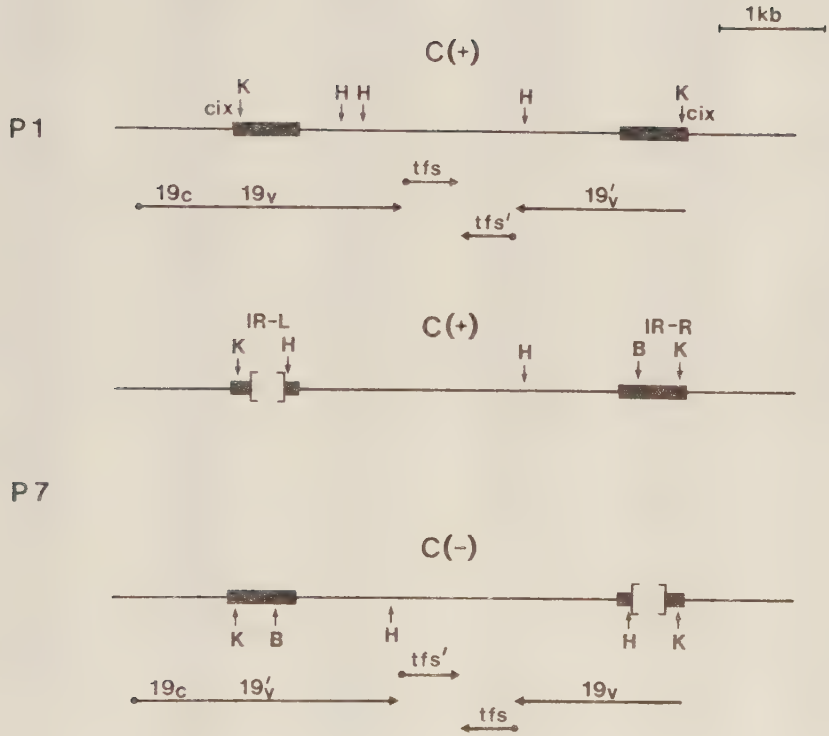


Abb. 5a. Schematischer Vergleich zwischen den Inversionssystemen der Bakteriophagen P1 und P7. Für P7 wurden beide möglichen Orientierungen des C-Segments dargestellt. Cix kennzeichnet die Inversionsstellen von P1 und P7 an den äußeren Enden der IRs. Klammern ([ ]) zeigen die Deletion innerhalb des linken IR's (IR-L) von P7 im Vergleich mit P1. 19c,v: konstanter bzw. variabler Teil von Gen 19; tfs und tfs' (tail fiber specificity) zeigen die zwei weiteren hypothetischen Leserahmen innerhalb des C-Segments. H: HindII; K: KpnI; B: BglII.

1180 1200 1220 1240

P1 5' ---------CTGGCGGTGGGATGAACCTGTTAATTACCTCAGTGGATGGTGATAAAACCGCAGGCGCGGGCGTCGGTGGATATTGGTGAATTTTACCAG

P7 5' ---------CTGGCGGTGGGATGAACCTGTTAATCACCTCAGTGGATGGTGATAAAACACCAGGCGCGGGCGTCCGTGGATATTGGTGAATTCTACCAG

MetAsnLeuLeuIleThrSerValAspGlyAspLysThrAlaGlyAlaAlaSerValAspIleGlyGluPheTyrGln

Pro

19 E

1280 1300 1320 1340 1360 1380

GTAACTATTCAGCAACGTAAGGATATTTCTCTTGCACTTAGTGCAGGCAAGAAATATGCAATTGTGCTGAAGGGAAGATACCTCCTTGGAGAAGATACCTACCAGGTGAATACCGCGTCA

GTAACTATTCAGCAACGTAAGGATATTTCTCTTGCACTTAGTGCAGGCAAGAAATATGCAATTGTGCTGAAGGGAAGATACCTCCTTGGAGAAGATACCTATCAGGTGAATACCGCGTCA

ValThrIleGlnGlnArgLysAspIleSerLeuAlaLeuSerAlaGlyLysLysTyrAlaIleValLeuLysGlyArgTyrLeuLeuGlyGluAspThrTyrGlnValAsnThrAlaSer

1400 1420 1440 1460 1480 1500

CATATTCATGCGGCTGAATTTGTTGCCAGAACCTATACCGATTCATATCAGTTAGGAGATGGGGAGCTGCTTGTTTGTACGGTGAATATCCCTGCTAGTGTATCTGCCATTACCCAGGAG

CATATTCATGCGGCTGAATTTGTTGCCAGAACCTATACCGATTCATATCAGTTAGGAGATGGGGAGCTGCTTGTTTGTACGGTGAATATCCCTGCTGGTGTATCTGCCATTACCCAGGAG

HisIleHisAlaAlaGluPheValAlaArgThrTyrThrAspSerTyrGlnLeuGlyAspGlyGluLeuLeuValCysThrValAsnIleProAlaSerValSerAlaIleThrGlnGlu

Gly

1520 1540 1560 1580 1600 1620

ATGATTGATACATCCGAGCGTATCAACCGCTCGATCGGCATTGATATTTCAGACTCTGTAACCAGTACCAGAAGTGATGTTGCTGCAAGTTCGCTGGCAGTTAAAAAAGCCTACGATCTG

ATGATTGATACATCCGAGCGTATCAACCGCACGATCGGCATTGATATTTCAGACTCTGTAACCAGTACCAGAAGTGATGTTGCTGCAAGTTCGCTGGCAGTTAAAAAAGCCTACGATCTG

MetIleAspThrSerGluArgIleAsnArgSerIleGlyIleAspIleSerAspSerValThrSerThrArgSerAspValAlaAlaSerSerLeuAlaValLysLysAlaTyrAspLeu

Thr

1640 1660 1680 1700 1720 1740

GCGAAAAGCAAGTATACGGCACAGGATGCAAGCACAACGCAAAAGGGATTAGTTCAGCTCAGTAGCGCAACTAACAGCGACAGCGAAACAATGGCGGCTACCCCTAAAGCTGTTAAGTCT

GCGAAAAGCAAGTATACGGCGCAGGATGCAAGCACAACGCAAAAGGGATTAGTTCAGCTCAGTAGCGCAACTAACAGCGACAGCGAAACAATGGCGGCTACCCCTAAAGCTGTTAAGTCT

AlaLysSerLysTyrThrAlaGlnAspAlaSerThrThrGlnLysGlyLeuValGlnLeuSerSerAlaThrAsnSerAspSerGluThrMetAlaAlaThrProLysAlaValLysSer

Ile

B 1760 1780 1800 1820 1840 1860

ATAAAAGATCTGGCTGATACCAAAGCGCCAATAGAAAGCCCGAGTCTGACAGGAACGCCAACCGCGCCGACGGCAGCGCAAGGTACAAACAGCACGCAGATCGCAAATACAGCCTTTGTT

ATAAAAGATCTGGCTGATACCAAAGCGCCAATAGAAAGCCCGAGTCTGACAGGAACGCCAAGCGCGCCGACGGCAGCACGAGGTACAAACAGCACGCAGATAGCAAATACAGCCTTTGTT

IleLysAspLeuAlaAspThrLysAlaProIleGluSerProSerLeuThrGlyThrProThrAlaProThrAlaAlaGlnGlyThrAsnSerThrGlnIleAlaAsnThrAlaPheVal

Ser Arg

```
                1880                1900                1920                1940                1960                H        1980
AAGGCAGCTATAACTGCACTTATCAACGGTGCGCCTGGCACACTGGATACGCTGAAAGAAATAGCGGCTGCGATCAATAACGACCCGAATTACGACACAACTATCAACAATGCCTTGGCT
AAGGCAGCTATAACTGCACTTATCAACGGTGCACCTGGCACACTGGATACACTTAAAGAAATAGCTGCTGCGATCAATAACGACCCGAATTTCAGCACAACTGTCAACAATGCTCTGGCC
LysAlaAlaIleThrAlaLeuIleAsnGlyAlaProGlyThrLeuAspThrLeuLysGluIleAlaAlaAlaIleAsnAsnAspProAsnTyrAspThrThrIleAsnAsnAlaLeuAla
                                                                                                PheSer      Val

                2000                2020                2040                2060                Sn                  2100
CTCAAAGCGCCTTTGGCAAGCCCTGCATTAACGGGTGTCCCTACTGCGCCTACGGCTGCACAAGGCACAAACAATACGCAAATCGC.ACGA.CGC.TACGTACGGGCTGCTATCTCTGCA
CTTAAAGCGCCTTTAGCAAGTCCTGCATTAACAGGAATACCTACTGCGCCTACCGCTGCACAGGGTACGAATAACACGCAGATTGCTACGACCGCTTATGTAAGAGCTGCCATATCCGCA
LeuLysAlaProLeuAlaSerProAlaLeuThrGlyValProThrAlaProThrAlaAlaGlnGlyThrAsnAsnThrGlnIleAla Arg Arg TyrValArgAlaAlaIleSerAla
                                                                                          ThrThrAla

                2120                2140                2160                2180                2200                2220
TTGGTCGGCTCATCACCCGAAGCTCTTGATACCCTGTACGAGCTTGCAGCAGCACTGGGCAATGACCCGAACTTTGCGACAACAATGACAAATGCGCTGGCAGGGAAACAGCCACTTGAT
CTGGTCGGCTCATCACCTGAAGCTCTTGATACCCTGAATGAGCTTGCAGCAGCACTGGGCAATGACCCGAACTTTGCGACAACAATGACAAATGCGCTGGCAGGGAAACAGCCACTTGAT
LeuValGlySerSerProGluAlaLeuAspThrLeuTyrGluLeuAlaAlaAlaLeuGlyAsnAspProAsnPheAlaThrThrMetThrAsnAlaLeuAlaGlyLysGlnProLeuAsp
                                      Asn

                2240                2260                2280                2300                2320                2340
GCAACTTTAACCGCGCTTGCTGGTCTTGCGACAGGCGCAAATAAATTGCCGTACTTTACCGGTACAGACACTGTTTCTCAGACTGACTTAACGTCAGTTGGTCGCGATATTCTGGCCAAA
GCAACTTTAACCGCGCTTGCTGGTCTTGCGACAGACGCAAATAAATTGCCGTACTTTACCGGTACAGACACTGTTTCTCAGACTGACTTAACGTCAGTCGGTCGCGATATTCTGGCCAAA
AlaThrLeuThrAlaLeuAlaGlyLeuAlaThrGlyAlaAsnLysLeuProTyrPheThrGlyThrAspThrValSerGlnThrAspLeuThrSerValGlyArgAspIleLeuAlaLys
                                    Asp

                IR-L                2380                K   2400                2420                2440                2460
ACAAGCATTCTTGCTGTTATCCAATACCTTGGTTTAAGAGAACTCGGTACCAGCGGTGAAAAGATCCCCCTGTTGAGCACGGCTAACACATGGAGTGCACGCCAGACTTTCAACGGCGGG
ACAAGCGTTCTTGCTGTTATCCAATACCTTGGTTTAAGAGAACTCGGTACCAGCGGTGAAAAGATCCCCCTGTTGAGCACGGCTAACACATGGAGTGCGCGCCAGACTTTCGACGGAGGG
ThrSerIleLeuAlaValIleGlnTyrLeuGlyLeuArgGluLeuGlyThrSerGlyGluLysIleProLeuLeuSerThrAlaAsnThrTrpSerAlaArgGlnThrPheAsnGlyGly
      Val                                                                                                          Asp

                2480                2500                2520                2540                2560                2580
ATCACCGGGGCGCTGACAGGGAACGCCGATACCGCAACGAAATTGAAAACAGCCAGAAACATTAATGGCGTCAGGTTCGATGGTTCTGGTGACATTAATATCAATACTCTGGTATCGCGC
ATCACCGGGGCACTGACAGGGAACGCCGACACCGCGACGAAATTGAAAACAGCACGCACTATTGGCGGTGTGGCATTTGATGGTACTGCGAATATTAAT.....................
IleThrGlyAlaLeuThrGlyAsnAlaAspThrAlaThrLysLeuLysThrAlaArgAsnIleAsnGlyValArgPheAspGlySerGlyAspIleAsnIleAsnThrLeuValSerArg
                                                                  Gly        Ala      ThrAlaAsn
```

```
                2600                2620                2640                2660                2680                2700
GGTCGCGTAACGGCCCTGGAGGCGAATGCACAGGGAACATCCGGGATTCAGCTGTATGAGGCATACAACAATGGCTACCCTTCCCCCTATGGCAATGTGCTTCACCTTAAAGGTGCCACC
GlyArgValThrAlaLeuGluAlaAsnAlaGlnGlyThrSerGlyIleGlnLeuTyrGluAlaTyrAsnAsnGlyTyrProSerProTyrGlyAsnValLeuHisLeuLysGlyAlaThr

                2720                2740                2760                2780                2800                2820
GCTGCTGGCGAAGGTGAGTTATTCATTGGCTGGAGTGGCACGAGCGGTGCCCATGCGCCCGTACATATCCGTTCGCGGTGGGATACTCATTCTGCCAACTGGTTTCAATGGGCGCAGGTC
AlaAlaGlyGluGlyGluLeuPheIleGlyTrpSerGlyThrSerGlyAlaHisAlaProValHisIleArgSerArgTrpAspThrHisSerAlaAsnTrpPheGlnTrpAlaGlnVal

                2840                2860                2880                2900                2920                2940
                                H
CATACGTCAAAAGATTCAATTCCCGGCGTCAATGCCAAAGGGGATCAGGATACCTCTGGTAATGCGGCTACAGCGACCAAGTTGCAGACAGCATGTACTATCAACGGTGTCTCGTTTGAT
                                                                                                                                
                TTACCTGGTGTTAACGTTGCGGGTAATCAGAATACATCCGGTAACGCGGCTACAGCGACCAAGTTGCAGACAGCATGTACTATCAACGGCGTCTCGTTTGAT
HisThrSerLysAspSerIleProGlyValAsnAlaLysGlyAspGlnAspThrSerGlyAsnAlaAlaThrAlaThrLysLeuGlnThrAlaCysThrIleAsnGlyValSerPheAsp
                Leu                 ValAla   Asn   Asn

                2960                2980                3000                3020                3040                3060
                                IR-L
GGTTCTAAAAATATTGAGCTAACGGCGGAAGATTTAAATCTACAGGAAACGGTAAACAAGGCTGATAACGCGGTTCAAAAGACAGGCGATACCTTGTCCGGTGGACTTACTTTTGAAAAC
                                                                                                                                
GGTTCTAAAAATATTGAGCTAACGGCGGAAGATTTAAATCTACAGGGATTTATTAATAAAGCAAATAATGCCGTTCAGCGTTCAGGCGATATCTTGTCCGGCGAACTTACTTTTGAAAAC
GlySerLysAsnIleGluLeuThrAlaGluAspLeuAsnLeuGlnGluThrValAsnLysAlaAspAsnAlaValGlnLysThrGlyAspThrLeuSerGlyGlyLeuThrPheGluAsn
                                                GlyPheIle           Asn             ArgSer      Ile         Glu

                3080                3100                3120                3140                3160                3180
                T                                   D
GACTCAATCCTTGCTTGGATTCAGAATACTGACTGGGCGAAGATTGGTTTTAAAAACGATGCCGACAGCGATGCTGATTCATACATGTGGTTCGAAACAGGCGACAACGGCAACGAATAT
                                                                                                                                
GACTCAATCCTTGCTAGGATTCGAAATACTGACTGGGCAAAGATTGGATTTAAAAATGATGCCGACAGCGACACAGATTCATACATGTGGTTTGAAACAGGCGACAACGGCAATGAATAT
AspSerIleLeuAlaTrpIleGlnAsnThrAspTrpAlaLysIleGlyPheLysAsnAspAlaAspSerAspAlaAspSerTyrMetTrpPheGluThrGlyAspAsnGlyAsnGluTyr
                Arg   Arg                                                                   Thr

                3200                3220                                                    5960                5980                6000
                                Sn H M Ha S Ba      PH
TTCAAATGGAGAAGCAAACAAAGTACCACAACAAAAGA----------------------------------GGAATATCCGCGCCGTTCTGATTTTTCTGCAATGACCCAGCGGCTAATTC
                                                C - S E G M E N T
TTCAAATGGAGAAGCAAACAAAGCACCACAACAAAAGA----------------------------------GGAATA.CTGCGCCGTTCTGGTTTT.CTGTAATG.CCCTGCGGCTAATTC
PheLysTrpArgSerLysGlnSerThrThrThrLys                                      IleAspAlaGlyAsnGlnAsnLysGlnLeuSerGlyAlaAlaLeuGlu
                                19          Dtfs        tfs'        19'                Ser ArgArgGluProLysArg TyrHis
```

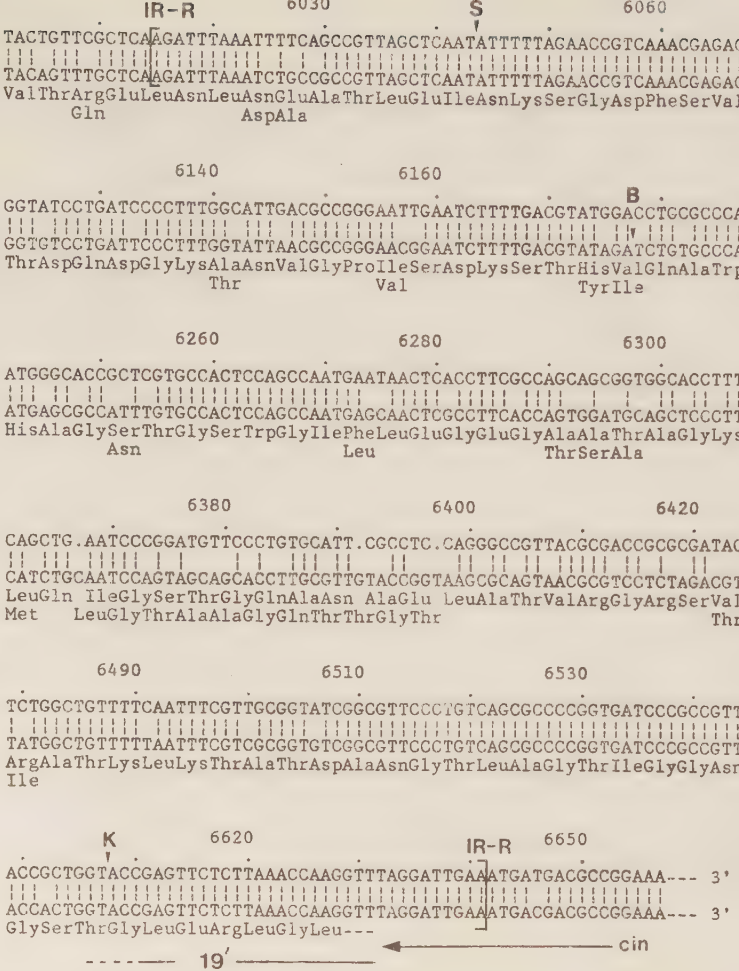


Abb. 5b. Sequenzvergleich der Schwanzfasergene von P1 und P7 im Bereich von 19c und den IRs. Die Nummerierung entspricht der bekannten P1 Sequenz (Sengstag et al., 1983; Kardas, 1984). Die Positionen wichtiger Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet (B: BglII; Ba: BalI; D: DraI; E: EcoRI; H: HindII; Ha: HaeIII; K: KpnI; M: MstI; M: MstI; P: PvuII; S: SspI; Sn: SnaBI; T: TaqI)

im Bereich des C-Segments eine Nichthomologie in Form eines DNA Loops, die durch eine Deletion oder Substitution in einem der beiden IRs von P7 erklärt wurde (Chow et al., 1978). Die Beobachtung, daß sich die Lage dieses Loops relativ zu einem zweiten Marker in der Heteroduplexstruktur scheinbar nicht änderte, führte außerdem zu dem Schluß, daß die sequenzspezifische Rekombination, die die Inversion des C-Segments bewirkt, in P7 im Gegensatz zu P1 an den inneren, nicht an den äußeren Enden der IRs erfolgen mußte. Da sich die Deletion in diesem Fall im konstanten Teil der Schwanzfaser befinden könnte, wären möglicherweise beide Schwanzfasergene gleichermaßen von ihr betroffen. Da jedoch eine genaue Kenntnis von Art und Lage dieser Sequenzenvariation fehlte und somit ihr Einfluß auf Struktur und Funktion der P7 Schwanzfasern nicht abzuschätzen war, konnte unter diesen Umständen auch nicht von entsprechenden Aktivitäten der Schwanzfasern in P1 und P7 ausgegangen werden.

Eine vorläufige Kartierung des Plasmids pWR1 mit KpnI, das das BamHI-6 Fragment des Phagen P7 mit dem invertierbaren Segment und dessen Inversionsfunktion *cin* trägt, hatte im Vergleich mit P1 bereits auf eine Deletion im Bereich des C-Segments hingewiesen (Abb. 5a). Zur Bestätigung dieser Analyse und um einen besseren Einblick in die durch die Deletion veränderte Architektur der P7 Schwanzfasern zu erhalten, wurden daher zunächst Abschnitte von pWR1 mit dem konstanten Bereich der Schwanzfasergene sowie den IRs sequenziert (vgl. Abb. 4), und die resultierende Sequenz sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene mit den bekannten P1-Sequenzen verglichen Abb. 5a und b). Tatsächlich weist einer der beiden IRs (im folgenden als linker IR, IR-L bezeichnet) verglichen mit dem IR von P1 eine 279bp lange Deletion auf, entsprechend einem Verlust von 93 Aminosäuren. Der rechte IR (IR-R) besitzt zwar bis auf eine einzige Aminosäure die gleiche Länge wie in P1, ist jedoch besonders im Mittelteil, also der Region, die in IR-L deletiert wurde,

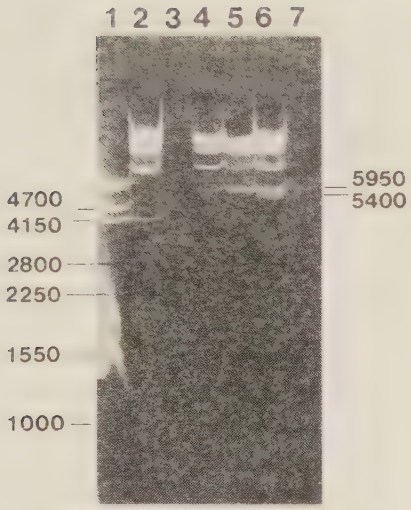
im Vergleich mit P1 stark divergiert. Im Gegensatz hierzu sind die Sequenzen des konstanten Teils der Schwanzfasergene gut konserviert, so daß sich in diesem Bereich nur geringfügige Unterschiede in der Aminosäuresequenz feststellen lassen (Abb. 5b).

Die Sequenzanalyse der IRs führte nun auch zu einer Korrektur des von Chow et al. (1978) für P7 angenommenen Rekombinationsmechanismus. Restriktionsschnittstellen innerhalb eines invertierbaren Segments verändern ihre Lage relativ zu Restriktionsschnitten im restlichen Genom in Abhängigkeit von der Orientierung dieses Segments. Bereits Iida und Arber (1979) berichteten von einem BglII-Schnitt innerhalb von BamHI-6 von P7, der sich aufgrund von Restriktionsanalysen innerhalb des invertierbaren Segments befinden mußte. Nach den hier ermittelten Sequenzdaten befindet sich dieser BglII-Schnitt innerhalb von IR-R. Eine Veränderung der relativen Lage dieses Schnitts mit der Orientierung des invertierbaren Segments ist daher nur dann möglich, wenn die Rekombination und damit die Inversion an den äußeren Enden der IRs erfolgt (Abb. 5a und 6). Dieser Mechanismus wird weiterhin dadurch bewiesen, daß die Sequenzierung der Übergänge zwischen den IRs und dem zum G-Segment von Mu homologen Teil des C-Segments eine eindeutige Sequenz lieferte. Erfolgte die Inversion an den inneren Enden der IRs, variierte also die Lage von IR-L und IR-R relativ zum invertierbaren Segment, so ergäbe eine Sequenzierung von den IRs in G über die Rekombinationsstelle bei einem Gleichgewicht der beiden Orientierungen, wie es in pWR1 vorliegt, zwei sich überlagernde, den beiden Orientierungen dieses Segments entsprechende Nukleotidfolgen. Dieser Befund schließt außerdem aus, daß Inversion an den inneren Enden abwechselnd mit einer Inversion an den äußeren Enden der IRs stattfindet. Die Identität der äußeren Enden der IRs von P1 und P7 legte nahe, daß diejenigen Sequenzen, die in P1 die Crossoverstellen *cix* für die Rekombination darstellen, auch in P7 diese Funktion

erfüllen. Dies wurde inzwischen auch durch die Ergebnisse von Iida et al. (1985) bestätigt (Abb. 5a).
Aus der Tatsache, daß sich die relative Lage von IRs und G-Segment zueinander nicht ändert, folgte unmittelbar, daß jeder der beiden IRs nur einer der beiden abwechselnd exprimierten Schwanzfasern zuzuordnen ist. Aufgrund der Sequenzhomologie von P1 und P7 konnte IR-L dem in C(+) Orientierung exprimierten Gen *19* zugeordnet werden, während IR-R Teil von *19'* ist (Abb. 5a)

1.1.2 Die Abhängigkeit des Wirtsbereichs des Phagen P7 von der Orientierung des C-Segments

Um den Einfluß der C-Segment-Orientierung auf die Infektivität des Phagen P7 zu testen, wurde die Expression jeweils eines der Schwanzfasergene durch die Insertion des Kn-Fragments aus pUC-4K blockiert. Die Mutagenese erfolgte in pWR1 wie in Material und Methoden beschrieben nach Partialverdau mit dem Restriktionsenzym TaqI. Zwei Clone mit Insertionen innerhalb des invertierbaren Segments, also den variablen Bereichen der Schwanzfasergene, wurden isoliert, wobei in pWR1-9 Gen *19'* und in pWR1-15 Gen *19* inaktiviert wurde. Nach Kreuzung der Plasmide in P1*Cmc*ts100 wurden unter den rekombinanten $Cm^r Kn^r$ Phagen die Hybride P1/P7#1-9 und P1/P7#1-15 isoliert, in denen sich diejenigen BglII-Fragmente wiederfinden, die in pWR1-9 bzw. pWR1-15 abhängig von der Orientierung des C-Segments entstehen. Dies zeigt, daß in diesen Hybridphagen das invertierbare Segment von P1 einschließlich der IRs durch die entsprechende Sequenz von P7 substituiert wurde (Abb. 6). P1/P7#1-9, der ein intaktes Gen *19* trägt, plattiert mit ähnlicher Effizienz wie P1 auf *E. Coli* K12 CSH50 oder S1652. P1/P7#1-15 mit einem defekten Gen *19* war dagegen nicht mehr zur Plaquebildung in der Lage (Tab. 3). Trotz einer Deletion von 93 Aminosäuren wird also auch in P7 Genprodukt 19 und nicht 19' für die Infektion dieser Stämme benötigt.



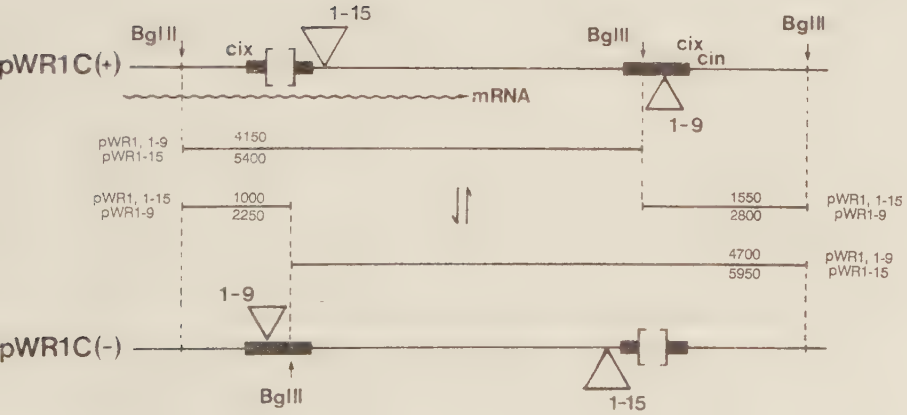


Abb. 6. Nachweis des C-Segments des Phagen P7 in den Hybridphagen P1/P7#1-9 und P1/P7#1-15 durch Restriktionsanalyse mit BglII (1,4% Agarose, 50mA, 4hs). 1: pWR1; 2: P7c1.9; 3: pWR1-9; 4: P1/P7#1-9; 5: P1Cmcts100; 6: P1/P7#1-15; 7: pWR1-15. In P1/P7#1-9 fehlen bedingt durch die Kn-Insertion (▽) innerhalb des rechten IR's die 1000bp und 1550bp langen Fragmente von P7c1.9 bzw. pWR1; dafür entstehen entsprechend der Länge des inserierten Kn-Fragments zwei neue Banden von 2250bp bzw. 2800bp. Ähnlich fehlen in P1/P7#1-15 die 4150bp und 4700bp langen Fragmente, die durch zwei Banden von 5400bp bzw 5950bp ersetzt wurden. Die Abhängigkeit der relativen Lage des BglII-Schnitts zum Restgenom von der Orientierung des C-Segments beweist, daß sich die Crossoverstellen cix an den äußeren Enden der IRs befinden müssen (vgl. Text).

Tabelle 3

Relative Plattierungseffizienzen von P7"C(+)" und P7"C(-)" auf CSH50 und S1652*

	CSH50	S1652
P1Cmcts100	1	1,1
P7*c*1.9	0,55	0,95
P1/P7#1-9	0,75	0,8
P1/P7#1-15	-	-

* Die relative Plattierungseffizienz wurde bezogen auf die Anzahl der pfu/ml Lysat von P1*Cmc*ts100 auf CSH50 ($4,2x10^9$). Gegeben sind die Werte eines Experiments. "-" bedeutet eine Plattierungseffizienz $<10^{-7}$. "C(+)" bzw. "C(-)" beschreibt den jeweiligen Phänotyp der getesteten Phagen (vgl. 1.2).

1.2 Charakterisierung primärer und sekundärer Rezeptoren der Bakteriophagen P1, P7 und Mu

Lipopolysaccharid(LPS)-Ketten an der äußeren Membran gramnegativer Bakterien dienen häufig auch als Phagenrezeptoren. Das Ausmaß der Adsorption der Phagen an die Bakterien, die der Penetration der Phagen vorausgeht und somit Voraussetzung für die Infektion ist, ist proportional zur Affinität des Phagen zu seinem Rezeptor. Als primäre Rezeptoren verstehen sich im folgenden diejenigen Strukturen, die die höchste Bindungsaffinität zum Phagen besitzen und somit von diesem bevorzugt erkannt werden. Sekundäre Rezeptoren stellen dagegen Strukturen mit deutlich geringerer Affinität dar. In dem hier benutzten Testverfah-

ren für Mu, P1 und P7 werden primäre und sekundäre Rezeptoren dadurch unterschieden, daß sich eine hohe Affinität der Phagen für einen primären Rezeptor in der Regel in einer Plaquebildung zeigt, während bei schwacher Adsorption aufgrund der geringeren Anzahl der infizierenden Phagenpartikel keine Plaques sichtbar sind. Die Infektion kann jedoch durch die Bildung von Lysogenen nachgewiesen werden. Bei diesem Unterscheidungskriterium muß allerdings zusätzlich beachtet werden, daß, wie anhand des Phagen T4 nachgewiesen wurde, Adsorption und Infektion nicht nur von der Art des Rezeptors, sondern auch von der Anzahl der zur Verfügung stehenden Rezeptormoleküle abhängig sind (Crawford und Goldberg, 1977).

Erste Untersuchungen zur Rezeptorstruktur für P1 auf *galU* Mutanten von *E. Coli* K12, die in der Anheftung eines Glucoserestes an das Core LPS defekt sind, ließen vermuten, daß Glucose einen Teil des Phagenrezeptors darstellt, da P1 auf solchen Mutanten nicht plattiert (Franklin, 1969). Gleichzeitig wurden jedoch Hostrange-Mutanten isoliert, die von dieser bakteriellen Mutation unabhängig sind (Franklin, 1969), und auch der in dieser Arbeit verwendete Phage P1*Cmc*ts100 stellt eine solche Mutante dar (Toussaint et al., 1978). Auch Wildtyp Phagen von P1 können jedoch an *galU* Stämme adsorbieren und ihre DNA injizieren (Toussaint et al., 1978). Ein ähnliches Bild wie P1 zeigt der Phage Mu, der ebenfalls nicht auf *galU* Mutanten plattiert, jedoch ebenfalls Hostrange-Mutanten bildet (Toussaint et al., 1978).

Systematische Rezeptorstudien für Mu und P1, die mit Hilfe verschiedener *E. Coli* Stämme mit unvollständigem Core LPS durchgeführt wurden und die auf der Plaquebildung und der Inaktivierung der Phagen durch gereinigtes LPS beruhten, identifizierten die primären Rezeptoren für Mu*G(+)* und Mu*G(-)* als endständige Glucose in α1-2 bzw. β1-6 glycosidischer Bindung und bestätigten außerdem die Bedeutung einer terminalen Glucose als Rezeptor für P1

(Sandulache et al., 1984; Kamp und Sandulache, 1983; Sandulache et al., 1985). Untersuchungen von sekundären Rezeptoren sollten nun zur näheren Charakterisierung derjenigen Strukturen führen, die wegen der schwachen Adsorption in Plattierungsexperimenten oder durch LPS-Inaktivierung nicht erkannt werden können. Die Verwendung von Testphagen, in denen nur jeweils eine der beiden möglichen Schwanzfasern exprimiert werden konnte, ermöglichte hierbei die Zuordnung der von den einzelnen Phagen erkannten Rezeptorstrukturen zur Orientierung der invertierbaren Segmente.

Zur Untersuchung der Rezeptoraffinitäten der Phagen Mu, P1 und P7 wurden wiederum die Rezeptormutanten von *E.Coli* K12 und *E. Coli* C mit den bekannten LPS-Strukturen verwendet (Sandulache et al., 1984; Sandulache et al., 1985; Abb. 7). In den hier benutzten Testphagen inaktivierte eine Kn-Insertion entweder das *gin* Gen, so daß das G-Segment in einer Orientierung fixiert war (Mu*G(+)gin*$^-$-116 bzw. Mu*G(-)gin*$^-$-116), oder die Insertion bewirkte den Defekt entweder von Schwanzfasergen *19* oder *19'* (P1*Cm*#5-11"C(+)" und P1/P7#1-9"C(+)" bzw. P1*Cm*#5-80"C(-)" und P1/P7#1-15 "C(-)", vgl. Abb. 6 und 9; die Beschreibung von P1 und P7 Phagen mit "C(+)" bzw. "C(-)" steht im folgenden kurz für den diskutierten Phänotyp der hier benutzten Testphagen; die zur Rezeptoranalyse verwendeten P1/P7 Hybride werden im folgenden auch kurz als P7"C(+)" bzw. P7"C(-)" bezeichnet). Die Kreuzung des invertierbaren Segments von P7 in P1, die zu den beschriebenen P1/P7 Hybriden führt, ermöglicht die Untersuchung der Rezeptoren von P1 und P7 unter identischen Bedingungen und unter Ausschluß von Einflüssen, die spezifisch für P7 sein könnten.

Zunächst wurde die Plaquebildung der Testphagen auf den Rezeptorstämmen bei 42°C untersucht. Nur wenn keine oder nur wenige Plaques zu beobachten waren, wurde die Bildung von Lysogenen getestet (Tab. 4; s. Material und Methoden, 5.5). Die im Genom der Testphagen codierten Antibiotika-Resisten-

zen, die bei diesen Experimenten transduziert wurden (der Begriff Transduktion wird hier im erweiterten Sinne für den Transfer der Resistenzen in den Wirtsstamm verwendet), dienten als Marker, mit deren Hilfe die Lysogenisierung leicht nachgewiesen werden konnte. Alle Rezeptorstämme wurden mit pBR322 transformiert, um gegen mögliche überlebende Lysogene im Testlysat selektionieren zu können. Die Transduktanten wurden bei 42°C auf Hitzesensitivität getestet, um die Lysogenie nachzuweisen. Um die Bildung spontaner Hostrange-Mutanten unter den Testphagen ausschließen zu können, wurden Phagen, die aus den Lysogenen erhalten wurden, erneut auf dem jeweiligen Rezeptorstamm auf Plaquebildung getestet. Da bei der Lysogenisierung der Rezeptormutanten C600 Mu^r#4, #35 und #38 auch Revertanten zum Wildtyp-LPS selektioniert worden sein konnten, wurden Lysogene dieser Mutanten mit St-1, einem Einzelstrangphagen mit gleichen Rezeptorerfordernissen wie Mu (Sandulache et al., 1984) typisiert. Da dieser Phage auf den getesteten Lysogenen keine Plaques bildete, konnten solche Revertanten ausgeschlossen werden.

1.2.1 Die Rezeptoren für P1"C(+)" und P7"C(+)"

Der primäre Rezeptor für P1*Cmc*ts100 war bereits als endständige α1-2, α1-3 oder β1-3 gebundene Glucose identifiziert worden (Sandulache et al., 1984), und die weiteren Experimente von Sandulache (1985) und dieser Arbeit mit verschiedenen Testphagen zeigen, daß diese Rezeptoren nur in C(+) Orientierung des invertierbaren Segments erkannt werden (Tab. 4). Nach den hier vorliegenden Ergebnissen der Plattierungs- und Lysogenisierungsexperimente infiziert P7"C(+)" dieselben Stämme wie P1"C(+)", so daß sich die Rezeptoren dieser beiden Phagen im wesentlichen gleichen müssen (Tab. 4). Ein Unterschied in der Plattierungseffizienz von P1 und P7 wird nur auf den Rezeptormutanten

E. Coli K 12

Gal Hep III
|α1,6 |1,7 I
GlcNac β1-6Glcα1-2Glcα1-3Glcα1-3Hepα1-3Hep1-KDO — C 600, CSH 50
II

Gal Hep
|α1,6 |1,7
Glcα1-3Glcα1-3Hepα1-3Hep1-KDO — C 600 Mu^{r}# 4

Hep
|1,7
Glcα1-3Glcα1-3Hepα1-3Hep1-KDO — S 1652

Hep
|1,7
Galα1-6Glcα1-3Hepα1-3Hep1-KDO — C 600 D108^{r}#10

Glcα1-3Hepα1-3Hep1-KDO — C 600 Mu^{r}#35

Hepα1-3Hep1-KDO — C 600 Mu^{r}# 38

Glc Hep
|β1,3 |1,7
Galα1-2Galα1-2Glcα1-3Glcα1-3Hepα1-3Hep — E. Coli C

Galα1-2Galα1-2Glcα1-3Glcα1-3Hepα1-3Hep — E. Coli C Mu^{r}# 12

Abb. 7. Struktur der verwendeten Rezeptormutanten von E. Coli K12 und E. Coli C (nach Sandulache et al., 1984 und Sandulache et al., 1985). Abkürzungen: GlcNac, N-Acetyl-Glucosamin; Glc, Glucose; Gal, Galactose; Hep, L-Glycero-D-Mannoheptose; KDO, 3-Deoxi-D-Manno-Octulosonsäure. Gepunktete Linien (...) bedeuten eine partielle Glycosylierung mit dem entsprechenden Zuckerrest.

Tabelle 4

Lysogenisierungsraten verschiedener Rezeptorstämme durch P1, P7 und Mu in (+) und (-) Orientierung der invertierbaren Segmente *

Rezeptorstamm	P1Cm#5-11 C(+)	P1Cm#5-80 C(-)	P1/P7#1-9 C(+)	P1/P7#1-15 C(-)	Mu-116 G(+)	Mu-116 G(-)
CSH50	+	1×10^{-5}	+	-	+	$2,5 \times 10^{-5}$
C600	+	-	+	-	+	1×10^{-7}
C600 Mu^r#4	+	-	$1,6 \times 10^{-4}$	-	-	-
C600 $D108^r$#10	-	-	-	-	-	-
C600 Mu^r#35	+	-	+	-	$2,5 \times 10^{-6}$	-
C600 Mu^r#38	+	-	6×10^{-7}	-	-	-
S1652	+	-	+	-	3×10^{-6}	-
E. Coli C	+	1×10^{-4}	+	-	2×10^{-4}	3×10^{-4}
E. Coli C Mu^r#12	-	-	-	-	-	-

* Alle Rezeptorstämme enthalten pBR322. Adsorptionstests erfolgten wie in Material und Methoden (5.5) beschrieben. Die angegebenen Lysogenisierungsraten stellen das Verhältnis Kn^r (Mu-116) bzw. Kn^rCm^r (P1 und P1/P7) Kolonien zur Gesamtzahl der Bakterien einer Kultur dar. "+": Phagentiter $>10^6$ pfu/ml, keine Lysogenisierungsraten bestimmt. "-": Lysogenisierungsrate $<10^{-8}$.

C600 Mu^r#4 und C600 Mu^r#38 (Abb. 7) sichtbar, auf denen, wie bereits von Sandulache et al. (1984) beschrieben, zwar P1, nicht aber P7 Plaques bildet. C600 Mu^r#4 besitzt wie S1652, auf dem sowohl P1"C(+)" wie P7"C(+)" Plaques bilden können, eine endständige Glucose in α1-3 Bindung. Bereits Sandulache et al. (1984) vermuteten jedoch, daß es sich bei C600 Mu^r#4 um eine "leaky" Mutante von C600 $D108^r$#10 handelt, dessen LPS-Kette nur partiell mit diesem Zuckerrest glycosyliert ist (Abb. 7). C600 Mu^r#38 trägt dagegen eine endständige Heptose in α1-3 Bindung, während Glucose nur in Spuren nachgewiesen wurde (Sandulache et al., 1984). Die Plaques von P1*Cmc*ts100 auf diesem Stamm sind jedoch sehr fein und daher ein genauer Titer nur schwer bestimmbar (Tab. 5). Die Transduktionsexperimente mit P1/P7#1-9 zeigen, daß auch mit P7"C(+)" eine Lysogenisierung dieser Mutanten stattfinden kann, so daß lediglich die Anzahl der penetrierenden Phagenpartikel zu gering zu sein scheint, um unter diesen Plattierungsbedingungen Plaques zu erzeugen. Plattiert man ein Lysat des Hybridphagen P1/P7#1-9 auf C600 Mu^r#4, so findet man im Gegensatz zu P7*c*1.9 Plaques mit einer Frequenz von ca. 10^{-7} relativ zu P1, und dieselbe Beobachtung wurde auch für das später beschriebene Hybrid P1/P7#5-50/34-1 gemacht, das als wesentlichen Bestandteil die Rezeptorbindungsstelle von Gen *19* von P7 und dadurch den Wirtsbereich von P7"C(+)" besitzt. (Tab. 5, vgl. Abb. 13). Dies ist durch die spontane Bildung von Hostrange-Mutanten zu erklären, da Phagen wie P1/P7#5-50/34-1hP1, die aus vereinzelt auftretenden Plaques von P1/P7#5-50/34-1 isoliert wurden, mit annähernd gleicher Effizienz auf S1652 wie auf C600 Mu^r#4 plattieren (Tab. 5). Wie durch die später beschriebenen Kreuzungsexperimente zwischen P1 und P7 und die Sequenzierung der Rezeptorbindungsstellen gezeigt wird, bewirkt wahrscheinlich eine Punktmutation im COOH-Terminus von Gen *19* diese Erweiterung des Wirtsbereichs von P7 (2.1.3.1). P1/P7#50/34-1 und P1/P7#50/34-1hP1 sowie die ebenfalls später beschriebenen Hybride P1/P7#2-22/50-2hP7

Tabelle 5

Relative Plattierungseffizienzen von P1, P7 und definierten P1/P7 Hybriden auf verschiedenen Rezeptorstämmen in Abhängigkeit von Mg^{2+} Ionen *

	S1652	CSH50	C600 Mu^r#4		C600 Mu^r#38	
			$-Mg^{2+}$	$+Mg^{2+}$	$-Mg^{2+}$	$+Mg^{2+}$
P1Cmcts100	1,6	1	0,7	0,7	10^{-3}	10^{-3}
P7c1.9	1,6	0,9	-	0,6	-	-
P1/P7#1-9	1,5	1,2	$8x10^{-8}$	0,9	-	-
P1/P7#5-50/34-1	1,6	0,6	$6x10^{-8}$	0,5	-	-
P1/P7#5-50/34-1hP1	1,6	1	0,6	0,7	10^{-3}	10^{-3}
P1/P7#5-22/50-1hP1	1,8	0,8	0,5	1,6	10^{-3}	10^{-3}
P1/P7#2-22/50-2hP7	1,2	0,9	$2,4x10^{-7}$	0,8	-	-
P1/P7#5-921/22-1	1,2	0,9	0,6	n.g.	n.g.	n.g.
P1/P7#2-34/29	1,6	0,8	$2x10^{-8}$	n.g.	n.g.	n.g.
P1/P7#2-34/20-1	1,2	0,6	0,5	n.g.	n.g.	n.g.
P1/P7#2	0,8	0,5	$3x10^{-8}$	n.g.	n.g.	n.g.

* Die relativen Plattierungseffizienzen wurden bezogen auf die Anzahl der pfu/ml Lysat von P1Cmcts100 auf CSH50 ($2,5x10^9$). Die Anzahl der pfu auf C600 Mu^r#38 wurde geschätzt. "-": Plattierungseffizienz $<10^{-8}$. Wirtsstamm für P1Cmcts100 und P1/P7#1-9 war CSH50, für P7c1.9 C600 BR211; alle anderen Phagen wurden aus S1652 präpariert. Konzentration an Mg^{2+}: 25mM. Die Titrationen auf S1652 und CSH50 erfolgten ohne Zusatz von Mg^{2+}. Zur Struktur der P1/P7 Hybride vgl. Abb. 9 und 13. n.g.: nicht getestet.

und P1/P7#2-22/50-1hP1, die auf C600 Mu^r#4 den Wirtsbereich von P7"C(+)" bzw. P1"C(+)" zeigen (vgl. Abb. 13), wurden auch auf der Rezeptormutante C600 Mu^r#38 getestet. Alle Hybridphagen, die wie P1*Cmc*ts100 auf C600 Mu^r#4 Plaques bilden, verhalten sich auch auf C600 Mu^r#38 wie dieser Phage, Hybride mit dem Wirtsbereich von P7 bilden dagegen keine Plaques (Tab. 5). Dies läßt vermuten, daß dieselbe Mutation, die eine bessere Adsorption der Phagen an C600 Mu^r#4 erlaubt, auch die Rezeptorbindung an C600 Mu^r#38 verbessert. Es ist nicht bekannt, warum Mutanten dieser Art nicht mit P7*c*1.9 gefunden werden konnten. Offensichtlich spielen hier noch andere Faktoren als die Bindungsspezifität des Phagen eine Rolle. Denkbar sind beispielsweise Funktionen des Phagen oder des Wirts, die die Lysogenisierung oder die Anzahl der freigesetzten Phagenpartikel beeinflussen. So wurde beobachtet, daß Lysate von P7*c*1.9, vermutlich bedingt durch die Natur der Repressormutation im *c1* Gen, häufig nur sehr niedrige Titer hatten und die Plaques schwächer waren als diejenigen von P1. Bei Experimenten zur Aufklärung des Mechanismus der Lysogenitätskontrolle isolierten Scott et al. (1977) außerdem temperatur-sensitive "clear plaque" Mutanten in acht verschiedenen Cistrons. Nur in wenigen Fällen wie z. B. dem c1 Repressor ist jedoch die Funktion der betroffenen Gene gut untersucht.

Neben einer α1-3 gebundenen Glucose dienen anscheinend auch Heptose-Reste als Rezeptoren für P1 und P7. Zwar konnten die ursprünglich isolierten P1 Phagen auf *galU* Mutanten, d.h. Mutanten, die in der Anheftung von Hexose-Einheiten an den Heptose II Rest (vgl. Abb. 7) defekt sind, keine Plaques bilden (Franklin, 1969), doch sind diese Phagen wie bereits erwähnt sowohl zur Adsorption wie zur Infektion dieser Mutanten in der Lage (Toussaint et al., 1978). Dies ist mit dem Ergebnis in Übereinstimmung, daß die Rezeptormutante C600 Mu^r#38, die in ihrem LPS einer *galU* Mutante entspricht, sowohl von P1 wie P7 infiziert werden kann. Heptose stellt

folglich für P1"(+)" und P7"C(+)" eher einen schwächeren sekundären Rezeptor dar, dessen Affinität zur Schwanzfaser durch eine Mutation im Phagen verbessert werden kann, und repräsentiert nicht, wie von Tomas und Kay (1985) vermutet, den normalerweise benötigten Rezeptor.
Auf der Rezeptormutante C600 D108^{r}#10, einem Stamm, der sich im tiefen Teil des Core LPS, der die Heptose-Reste enthält, nicht von anderen infizierbaren Stämmen unterscheidet (Abb. 7), erfolgt weder durch P1 noch durch P7 eine Infektion (Tab.4). Die intern gebundenen Heptose-Reste I und II oder die abzweigende Heptose III kommen folglich als Rezeptoren nicht in Betracht, da kaum zu erwarten ist, daß der Zugang zu diesen Heptose-Resten in C600 D108^{r}#10 durch eine sterische Hinderung erschwert wird (vgl. Abb. 7). Durch diese Überlegungen kann gleichzeitig ausgeschlossen werden, daß die Hostrange-Mutanten einen vollkommen neuartigen Rezeptor erkennen, so daß auch als Rezeptor in C600 Mu^{r}#4 nur die α1-3 gebundene Glucose in Betracht kommt. Die geringere Rezeptordichte dieses Stammes wird folglich durch eine erhöhte Bindungsaffinität an den Rezeptor kompensiert. Dieselbe Mutation, die eine bessere Adsorption der Phagen an C600 Mu^{r}#4 bewirkt, führt auch zur Plaquebildung auf C600 Mu^{r}#38 und hat somit nicht nur eine höhere Rezeptoraffinität für α1-3 gebundene Glucose zur Folge, sondern bewirkt auch eine bessere Bindung an eine endständige Heptose, wobei die erkannte Rezeptorstruktur wahrscheinlich ebenso von der Art des Zuckers wie von der α1-3 glycosidischen Bindung bestimmt wird. Die Annahme, daß auch in C600 Mu^{r}#38, dessen Heptose-Reste nur sehr schwach glycosyliert zu sein scheinen, ausschließlich diese Glucose-Reste für die erhöhte Infektivität verantwortlich sind, ist nur dann mit den Ergebnissen von Franklin (1969), Toussaint et al. (1978) und Tomas und Kay (1985) in Einklang zu bringen, wenn man annimmt, daß die von diesen Autoren verwendeten Rezeptorstämme "leaky" waren und eine partielle Glycosylierung des Heptose-Restes erlaubten.

Nicht nur die Konzentration der Reaktionspartner, d. h. von Schwanzfaser- oder Rezeptormolekülen, sondern auch Umwelteinflüsse wie Temperatur, pH und Ionenkonzentration können bei der Adsorption der Phagen an ihre Wirtszellen eine bedeutsame Rolle spielen. Bereits Bertani (1951) hatte eine Adsorptionsabhängigkeit von P1 Phagen von Ca^{2+} Ionen festgestellt. Walker und Anderson (1970) hatten über den stabilisierenden Einfluß von Mg^{2+} auf Phagenpräparationen von P1 berichtet, und Tominaga und Enomoto (1986) zeigten, daß Ca^{2+} durch Mg^{2+} ersetzt werden kann. Bereits von Franklin (1969) wurden jedoch Phagen isoliert, die durch spontane Mutationen unabhängig von diesen Ionen werden können, und der in der vorliegenden Arbeit verwendete Phage P1*Cmc*ts100 erwies sich in den Plattierungsexperimenten ebenfalls als eine solche Mutation. Auch mit P7*c*1.9 oder P1/P7#1-9 wurde auf CSH50 oder S1652 keine Mg^{2+} Abhängigkeit beobachtet. Die Hostrange-Mutanten, die mit P7"C(+)" auf C600 Mu^r#4 beobachtet wurden, ließen jedoch für diesen Rezeptorstamm eine Ionenabhängigkeit der Adsorption von P7 möglich erscheinen. Tatsächlich plattierten sowohl P7*c*1.9 als auch alle P1/P7 Hybride mit dem Wirtsbereich von P7 auf C600 Mu^r#4 mit nahezu gleicher Effizienz wie P1*Cmc*ts100, wenn ihre Lysate unter dem Einfluß von 25mM $MgCl_2$ ausplattiert wurden (Tab. 5). Hingegen ist die Plattierungseffizienz auf C600 Mu^r#38 durch Zusatz von Mg^{2+} Ionen nicht zu verbessern.

Der Einfluß von Mg^{2+} Ionen auf die Infektivität der Phagen läßt sich verschiedenartig interpretieren. Als erste Möglichkeit ist eine Stabilisierung der Schwanzfaser in Betracht zu ziehen. Eine Stabilisierung der Schwanzfaser könnte eine höhere Anzahl von Schwanzfasermolekülen pro Virion zur Folge haben, und somit die bessere Infektion der Rezeptormutante C600 Mu^r#4 durch P7"C(+)" erklären. Eine Stabilisierung von Phagenlysaten, die unter dem Einfluß von Mg^{2+} Ionen ihre Infektivität lange Zeit unverändert behalten können, wurde auch von Walker und Anderson (1970) berichtet.

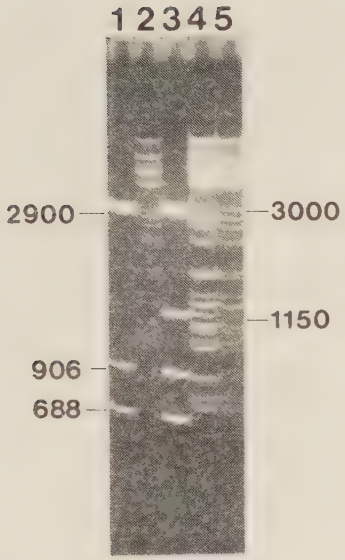
Die zweite und wahrscheinlichere Möglichkeit für die Wirkungsweise von Mg^{2+} besteht in einer durch solche Ionen verursachten Konformationsänderung entweder der Schwanzfaser oder des Rezeptormoleküls, die den Zugang zu dem Rezeptor erleichtert und/oder die Bindung verbessert. Bis zu welchem Grad Mg^{2+} Ionen eine Konformationsänderung der Schwanzfaser bewirken können, ist nicht bekannt. Mit Sicherheit existiert jedoch eine starke Wechselwirkung zwischen Mg^{2+} und Ca^{2+} Ionen und den LPS-Molekülen der Zelloberfläche. Schindler und Osborn (1979) weisen zwei starke Bindungsstellen für diese Ionen im KDO-Bereich des LPS-Moleküls nach. Möglicherweise spielen diese Ionen eine Rolle in der Anordung und Erhaltung der molekularen Organisation der äußeren Membran durch LPS - Protein oder LPS - LPS Wechselwirkung. Bei letzterer Interpretation könnte die geringere Rezeptordichte in C600 Mu^r#4 dann durch eine bessere Zugänglichkeit des Rezeptors und/oder eine bessere Bindung ausgeglichen werden. In C600 Mu^r#38, dessen LPS Core stark verkürzt ist, kann ein solcher Effekt durch Mg^{2+} Ionen offenbar nicht mehr erreicht werden.

1.2.2 Die Rezeptoren für P1"C(-)" und P7"C(-)"

Die Homologie der invertierbaren Elemente und die ähnlichen Rezeptoreigenschaften von Mu*G(+)* und P1"C(+)" ließen auch für P1"C(-)" eine ähnliche Bindungsspezifität wie für Mu*G(-)* erwarten. Dennoch gelang es nicht, auf *Enterobacter Cloacae* oder *Erwinia chrysanthemi*, Wirten für Mu*G(-)*, Lysogene von P1 zu erhalten (Sandulache, 1985). Auf *E. Coli* C, einem Stamm, der ebenfalls von Mu*G(-)* infiziert werden kann (van de Putte et al., 1980), konnten dagegen, wie auch von Iida (1984) beschrieben, Lysogene von P1"C(-)" isoliert werden (Tab. 4). Als Rezeptor für Mu*G(-)* in *E. Coli* C war bereits die β1-3 gebundene Glucose der LPS-Seitenkette identifiziert worden (Abb. 7; Kamp und Sandulache, 1983), und diese

Gruppierung erwies sich auch als Rezeptor für P1"C(-)", da die Mutante *E. Coli* C Mu^r#12, in der diese Glucose fehlt, nicht mehr infiziert werden kann (Abb. 7, Tab. 4). Eine weitaus geringere Infektionsrate als auf *E. Coli* C findet man mit P1"C(-)" auf *E. Coli* K12 CSH50 (Tab. 4). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Iida (1984) überein, der für *E. Coli* K12 ebenfalls eine schwache Infektivität von P1"C(-)" beobachtete. Als Rezeptor kommt hier entweder ein β1-6 gebundenes N-Acetyl-Glucosamin, mit dem der Terminus des LPS von *E. Coli* K12 partiell glycosyliert ist, oder aber die darauffolgende α1-2 gebundene Glucose in Betracht. Da als Rezeptor in *E. Coli* C eine β1-3 gebundene Glucose fungiert, erscheint auch in CSH50 der β1-6 gebundene Zucker als Rezeptor stereochemisch günstiger als α1-2 Glucose. Zudem konnten auch auf allen anderen Rezeptorstämmen mit endständigen α-gebundenen Zuckerresten keine Lysogene für P1"C(-)" isoliert werden (Tab. 4). Die Tatsache, daß gereinigtes LPS von *Erwinia chrysanthemi* mit einer β1-6 gebundenen Glucose keine meßbare Inaktivierung von P1*C(-)cin*$^-$ zeigte (Sandulache, 1985), läßt vermuten, daß die Bindung des Phagen an diese Gruppierung zu schwach ist, als daß sie in LPS-Bindungstests in Form einer Inaktivierung des Phagen nachgewiesen werden könnte, und dies erklärt vielleicht auch die geringe Infektionsrate auf CSH50. Überraschend wurden mit *E. Coli* K12 C600, einem weiteren Stamm mit Wildtyp-LPS, keine Lysogene gefunden. Möglicherweise sind für diesen Effekt Unterschiede in der Anzahl der Rezeptormoleküle, also wahrscheinlich der N-Acetyl-Glucosamin-Reste, verantwortlich.

Wie für Mu*G(-)* (van de Putte et al., 1980) waren auch für P1"C(-)" Hostrange-Mutanten auf *E. Coli* C beschrieben worden (Iida, 1984). Dies war wegen der hohen Homologie der invertierbaren Elemente zu erwarten gewesen. Bei den Experimenten dieser Arbeit gelang es jedoch nicht, unter den Plattierungsbedingungen für Mu, d. h. ohne Zusatz zweiwertiger Ionen, Mutanten von P1"C(-)" Phagen auf *E. Coli*



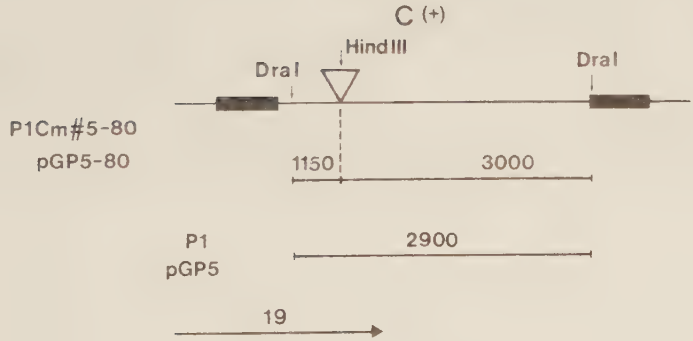


Abb. 8. Nachweis der Kn-Insertion (▽) von pGP5-80, P1Cm#5-80 und P1Cm#5-80h2 durch Doppelverdau mit DraI und HindIII in Gen 19 (1,4% Agarose, 20mA, 16hs). 1: pGP5; 2: P1Cmcts100; 3: pGP5-80; 4: P1Cm#5-80; 5: P1Cm#5-80h2. Ein 2900bp langes DraI-Fragment in P1Cmcts100 (pGP5) verschwindet in P1Cm#5-80 und P1Cm#5-80h2 (pGP5-80), und wird durch zwei neue Banden der Längen 1150bp und 3000bp ersetzt. Ihre Summe von 4150bp entspricht der Summe des 2900bp Fragments aus P1Cmcts100 und des 1250bp langen Kn-Fragment aus pUC-4K. Der Verlust des 2900bp Fragments in pGP5-80 wird nicht sichtbar, da in diesem Plasmid ein zweites Fragment gleicher Wanderungsgeschwindigkeit existiert. Die Restriktionsmuster von P1Cm#5-80 und der Hostrange-Mutante P1Cm#5-80h2 sind identisch.

C zu isolieren. Werden jedoch P1"C(-)" Lysate zusammen mit 25mM $MgCl_2$ ausplattiert, so erhält man Plaques mit einer relativen Häufigkeit von 10^{-8} - 10^{-7}. Solche plaquebildenden Phagenpartikel stellen in der Tat Hostrange-Mutanten dar, da Isolate aus solchen Plaques wie P1*Cm*#5-80h1 auf *E. Coli* C mit einem Titer von $>10^9$ plattieren, wenn wiederum 25mM Mg^{2+} zugesetzt werden; ohne Mg^{2+} sind dagegen erwartungsgemäß keine Plaques sichtbar (Tab. 6). Hostrange-Mutanten von P1"C(-)" entstehen demnach zwar spontan, werden aber nur unter dem Einfluß relativ hoher Mg^{2+} Konzentrationen als Plaques sichtbar. Auch in diesem Fall lassen sich jedoch von Ionen unabhängige Mutanten von P1"C(-)" erhalten. Nützt man die Fähigkeit der P1"C(-)" Phagen aus, auch ohne Mg^{2+} Ionen *E. Coli* C zu lysogenisieren, erzeugt aus einer solchen Population lysogener Zellen ein neues Lysat und wiederholt diesen Zyklus ausgehend von der neuen Phagenpopulation mehrmals, so selektioniert man schließlich P1"C(-)" Phagen, die unabhängig von der Mg^{2+} Konzentration mit gleicher Effizienz wie P1*Cm*cts100, also P1"C(+)" auf *E. Coli* C plattieren (P1*Cm*#5-80h2, Tab 6). Die Restriktionsanalyse des Ausgangsphagen P1*Cm*#5-80 im Vergleich mit der von der Ionenkonzentration unabhängigen Mutante P1*Cm*#5-80h2 zeigt keinen Unterschied im Restriktionsmuster (Abb. 8), so daß ausgeschlossen werden kann, daß die Plaquebildung auf eine Restauration von Gen *19* zurückzuführen ist.

Tabelle 6

Sensitivität von *E. Coli* C gegenüber P1"C(-)" und P7"C(-)"

	Plattierungseffizienz auf *E. Coli* C *	
	+ Mg^{2+}	- Mg^{2+}
P1*Cmc*ts100	1	1
P1*Cm*#5-80	2×10^{-7}	-
P1*Cm*#5-80h1	1	-
P1*Cm*#5-80h2	1	1
P1/P7#1-15	-	-

* Die Plattierungseffizienz wurde berechnet als das Verhältnis der pfu des getesteten Stammes zur Anzahl der pfu von P1*Cmc*ts100. "-": Plattierungseffizienz $<10^{-7}$. Konzentration an Mg^{2+} Ionen 25mM.

Ebenso wie auf C600 Mu^r#4 zeigt sich also auch auf *E. Coli* C eine starke Abhängigkeit der Phagenadsorption von Mg^{2+} Ionen, und wie bei den Hostrange-Mutanten auf C600 Mu^r#4 ist die verbesserte Adsorption der P1"C(-)" Mutanten auf eine erhöhte Rezeptoraffinität der Phagen zurückzuführen. Die Mutation, die in Mu*G(-)* zur Bildung von HostrangeMutanten auf *E. Coli* C führt, konnte im COOH-Terminus des Schwanzfasergens *S'* lokalisiert werden (Kamp et al., 1984). Aufgrund der großen Ähnlichkeit der DNA-Sequenzen der invertierbaren Elemente von P1 und Mu sind auch die Mutationen in P1"C(-)" in dieser Region zu erwarten.
Tominaga und Enomoto (1986) berichten in ihrer Arbeit, daß P1*C(-)cin*$^-$ Phagen unter dem Einfluß hoher Mg^{2+} Konzentrationen auf *E. Coli* C mit gleicher Effizienz wie P1*C(+)cin*$^-$, ohne Mg^{2+} jedoch mit erheblich niedrigerer Frequenz plattieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen nunmehr vermuten, daß Tominaga und Enomoto bereits von einer P1 Hostrange-Mutante ähnlich P1*Cm*#5-80h1 mit verbessertem Adsorptionsverhalten an *E. Coli* C ausgingen.
Weder mit noch ohne Mg^{2+}-Ionen wurde auf den verschiedenen Rezeptorstämmen eine Infektion durch P1/P7#1-15"C(-)" beobachtet (Tab. 4 und 6). Trotz der starken Homologie der invertierbaren Segmente in P1 und P7 scheinen daher die Rezeptoren für P1"C(-)", terminale Glucose in β1-6 oder β1-3 Konfiguration, die Adsorption von P7"C(-)" nicht zu ermöglichen. Diese Experimente erlauben jedoch keine Unterscheidung, ob in C(-) Orientierung eine Schwanzfaser mit unterschiedlicher Rezeptorspezifität synthetisiert wird, oder ob ein Defekt in der Synthese dieser Schwanzfaser für dieses Verhalten verantwortlich ist.

1.2.3 Der sekundäre Rezeptor für Mu*G(+)*

Mu*G(+)* Phagenpartikel bilden Plaques auf Wirtsstämmen, deren LPS-Core eine endständige Glucose in α1-2 glycosidischer Bindung trägt (Sandulache et al., 1984). Lysogene wurden jedoch auch auf Stämmen mit in α1-3 oder β1-3 Konfiguration gebundenen endständigen Glucose-Resten gefunden (Tab. 4). Der hier zu Tage tretende schwächere sekundäre Rezeptor für Mu*G(+)*, scheint somit dem primären Rezeptor für P1"C(+)" und P7"C(+)" Phagen zu entsprechen. Eine Ausnahme bildet lediglich C600 Mu^r#4, auf dem trotz einer in der LPS-Struktur nachgewiesenen terminalen Glucose in α1-3-Bindung keine Kn-Transduktanten gefunden werden konnten. Dieser Stamm stellt jedoch wie bereits beschrieben eine "leaky" Mutante von C600 $D108^r$#10 dar (Sandulache et al., 1984). Man muß in diesem Fall annehmen, daß die Anzahl der Rezeptormoleküle für eine Infektion mit Mu*G(+)* nicht mehr ausreichend ist. Mutationen ähnlich denjenigen, wie sie im Schwanzfasergen *19* von P7 gefunden wurden, konnten für Mu*G(+)* jedoch nicht beobachtet werden. Offensichtlich kann auch eine Mutation in Mu*G(+)* den ohnehin schwachen sekundären Rezeptor nicht so verbessern, daß der Mangel an Rezeptormolekülen kompensiert werden kann. Auch auf der Mutante C600 Mu^r #38, die in ihrem LPS-Core einer *galU* Mutante entspricht, wurden keine Hostrange-Mutanten beobachtet. Dies unterscheidet sich von Ergebnissen von Toussaint et al. (1978), die Wirtsbereichsmutanten für Mu auf *galU* Mutanten beschreiben. Der Grund hierfür liegt möglicherweise in Unterschieden der verwendeten Rezeptorstämme (die *galU* Mutante von Toussaint könnte "leaky" sein) oder der verwendeten Testphagen.

Spontane Mutationen, die zu einer Erweiterung des Wirtsbereichs ähnlich demjenigen von P1 führen, waren für Mu*G(+)* auch für den Phagen MupAp gefunden worden. Diese Mutanten bildeten auf S1652 und C600 Mu^r#35 Plaques, wobei sich jedoch bereits der Ausgangsphage MupAp durch mehrere

Basenaustausche von Mu Wildtyp-Phagen unterscheidet (Sandulache, 1985). In seltenen Fällen wurden bei Plattierungsexperimenten mit Mu*G(+)gin*$^-$ 445-5 ebenfalls Plaques auf S1652 mit einer Häufigkeit von ca. 10^{-8} festgestellt, wenn frische Phagenlysate sofort nach Entfernung der Zelltrümmer ausplattiert wurden. Die von S1652 isolierte Mutante Mu*G(+)gin*$^-$ 445-5h weist jedoch einen hohen Grad an Instabilität auf. Sie plattiert bereits unmittelbar nach der Präparation eines Lysats auf CSH50, C600, S1652 und *E. Coli* C verglichen mit Mu*G(+)gin*$^-$ 445-5 nur mit niedriger Frequenz, und nach weniger als 24 Stunden bei 4°C sinkt der Titer auf unter 10^2 pfu/ml (Tab. 7). Da keine Sequenz von Mu*G(+)gin*$^-$ 445-5h bestimmt wurde, ist nicht bekannt, ob solche Wirtsbereichsmutanten auf eine Spezifitätsänderung der Schwanzfaser oder auf einen anderen Effekt zurückzuführen sind. So wurde für den Phagen T4 eine andere Klasse von Wirtsbereichsmutanten gefunden, die einen Defekt in der Basisplatte aufweisen. Solche Phagen sind in ihrer Rezeptorerkennung weniger spezifisch und zeigen ebenfalls eine auffallende Instabilität. Entsprechend könnte auch die Erweiterung des Wirtsbereichs der Mutante Mu*G(+)gin*$^-$ 445-5h auf einen solchen Defekt in der Basisplatte zurückzuführen sein. Die Aufklärung der Natur dieser Mutanten macht jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

Tabelle 7

Titration von Mu*G(+)gin*$^-$ 445-5h *

	Mu*G(+)gin*$^-$ 445-5h t=0	Mu*G(+)gin*$^-$ 445-5h t>16hs	Mu*G(+)gin*$^-$ 445-5
CSH50	$1x10^6$	$<10^2$	$9,4x10^9$
C600	$8x10^5$	$<10^2$	$8,9x10^9$
S1652	$\approx 10^4$ **	$<10^2$	$<10^2$
E. Coli C	$\approx 10^4$ **	$<10^2$	$<10^2$

* Angabe des Phagentiters in pfu/ml; t=0: Lysate wurden unmittelbar nach ihrer Präparation aus S1652 ausplattiert; t>16hs: Lysate wurden bei 4°C über Nacht aufbewahrt und dann erneut ausplattiert.

** Wert geschätzt, da die sehr feinen Einzelplaques zu schwach sind, um einen genauen Titer zu ermitteln.

1.2.4 Der sekundäre Rezeptor für Mu*G(-)* Phagen

Der primäre Rezeptor für Mu*G(-)* Phagen in *Erwinia chrysanthemi* war als terminale Glucose in β1-6 glycosidischer Bindung identifiziert worden (Sandulache et al., 1985). Da jedoch auch die Infektion der *E. Coli* K12 Wildtyp Stämme CSH50 und C600 beobachtet worden war, wurde ein sekundärer Rezeptor unbekannter Struktur für Mu*G(-)* vorgeschlagen (Kamp und Stern, 1986). Die hier mit Mu*G(-)gin*$^-$-116 durchgeführten Experimente lieferten Lysogene mit CSH50 und C600, auf den anderen Rezeptorstämmen von *E. Coli* K12 erfolgte dagegen keine Transduktion (Tab. 4). Dies läßt zwei Möglichkeiten eines sekundären Rezeptors für CSH50 und C600 offen. Einerseits könnte das in β1-6 Konfiguration gebundene N-Acetyl-Glucosamin, mit dem das LPS von *E. Coli* K12 partiell substituiert wird (Prehm et al., 1976), die β1-6 gebundene Glucose in *Erwinia* als Rezeptor ersetzen. Möglicherweise hängt die Infektivität der Mu*G(-)* Phagen vom Ausmaß der Glycosylierung der einzelnen *E. Coli* K12 Stämme mit N-Acetyl-Glucosamin ab. Durch einen solchen quantitativen Effekt könnte ähnlich wie bei P1"C(-)" die im Vergleich mit CSH50 wesentlich geringere Anzahl der Kn-Transduktanten auf C600 erklärt werden. Denkbar ist jedoch auch ein qualitativer Unterschied in der Bindungsaffinität zwischen Glucose und N-Acetyl-Glucosamin, verursacht durch eine sterische Hinderung des in Position 2 der Glucose befindlichen N-Acetyl- Rests. Nur in diesem Fall könnte man tatsächlich von einem sekundären Rezeptor sprechen.
Als Alternative zu β1-6 gebundenem N-Acetyl-Glucosamin ist auch die α1-2 gebundene Glucose denkbar. Da Mu*G(-)* jedoch seine höchste Adsorptionsrate auf *E. Coli* C besitzt, dessen Rezeptor eine terminale Glucose in β1-3 glycosidischer Bindung ist (Tab. 4), erscheint analog der Argumentation für P1"C(-)" Phagen auch hier der β1-6 gebundene Zuckerrest als der wahrscheinlichere Rezeptor.

2. Strukturelle und funktionelle Analyse der Schwanzfasergene von P1, P7 und Mu

Zur strukturellen und funktionellen Analyse der Schwanzfasergene von P1, P7 und Mu sollten in denjenigen Genen, die am Aufbau der Schwanzfaser beteiligt schienen, Insertionen, Substitutionen und Deletionen erzeugt werden. Hierbei ermöglichten die bekannten Nukleotidsequenzen der potentiellen Schwanzfasergene der Phagen und die dadurch bekannten Restriktionsschnittstellen die *in vitro* Konstruktion genau definierter Mutanten. Die Insertionsmutagenese mittels eines Kn-Resistenzgens wurde wegen der Größe des Phagengenoms in clonierten Fragmenten durchgeführt, und die Insertionen anschließend aus den Plasmiden in die Phagen Mu bzw. P1 gekreuzt (Material und Methoden). Die Kn-Resistenz konnte hierbei direkt als Selektionsmarker für die Rekombinanten verwendet werden. Die aus solchen Kreuzungen resultierenden Phagen sind in Abb. 9 zusammengestellt.

Es war zu erwarten, daß Gene, die von einer Kn-Insertion betroffen werden, in ihrer Funktion defekt sind. Dies ermöglichte es, das Modell von jeweils zwei abwechselnd exprimierten Genen, *S* und *U* bzw. *S'* und *U'*, wie es zuerst für den Phagen Mu vorgeschlagen (Giphart-Gassler et al., 1982) und aufgrund genetischer Experimente und der ermittelten Sequenzhomologie auch auf P1 und P7 übertragen wurde (Kamp et al., 1984; s. a. Abb. 1), auch für diese Phagen zu bestätigen. Walker und Walker (1983) konnten bereits zeigen, daß eine *amber* Mutante, die in Gen *19* kartiert wurde, zum Verlust eines 105.000D Proteins und zu schwanzfaserlosen Phagenpartikeln führt. Das Verhalten verschiedener Insertionsmutanten von P1 und P7 im konstanten (19_C) und variablen (19_V) Teil von Gen *19*, die sämtlich auf

Stämmen wie S1652 oder CSH50 keine Plaques bilden, bestätigte nun die Rolle dieses Genprodukts als Bestandteil der Schwanzfaser. Auch die Insertionen in dem hypothetischen Gen *tfs*, das sich Gen *19* anschließt und dem *U* Gen in Mu entsprechen sollte, führen zu nichtinfektiösen Phagen. Dies zeigt, daß auch dieses Gen in einer bisher unbekannten Weise zum Aufbau des Schwanzfaserkomplexes beiträgt und bestätigt auch für P1 und P7 das Modell der paarweise exprimierten Gene. Alle anderen Insertionen im invertierbaren Element, also Insertionen in $19'_v$ oder dem hypothetischen Gen *tfs'*, dem zu *U'* in Mu analogen Gen, haben erwartungsgemäß keinerlei Einfluß auf die Plaquebildung der Phagen (Tab. 8). Obwohl das Aufbauprinzip der Schwanzfasergene der Phagen P1, P7 und Mu sehr ähnlich ist, zeigen sich beispielsweise in den Rezeptorspezifitäten Variationen, die sich ausnutzen lassen, um strukturelle und funktionelle Domänen der Schwanzfaser besser verstehen zu lernen. So sollte ein genetischer Austausch derjenigen Sequenzen, die die Information für die Rezeptorspezifität beinhalten, eine genauere Lokalisierung der LPS-Bindungsstelle ermöglichen. Für die hierzu notwendigen Kreuzungsexperimente konnten die Kn-Insertionen in den Phagen als physikalische Marker dienen, mit deren Hilfe sich definierte Gensegmente austauschen ließen. Ein weiterer Vorteil dieser Art der Insertionsmutagenese bestand darin, daß das Kn-Fragment so ausgeschnitten werden kann, daß Linkerinsertionen mit einer definierten Anzahl an Basenpaaren zurückbleiben (s. Material und Methoden, 4.2.1; Abb. 2). Da durch solche Insertionen der Leserahmen des betroffenen Gens nicht zerstört wird, erhält man so eine Möglichkeit, Schwanzfasern mit genetisch veränderter Information zu konstruieren. Die Gene können auf diese Weise in ihrer gesamten Länge abgetastet und verschiedene Bereiche des betroffenen Genprodukts auf ihre Flexibilität untersucht werden.

Tabelle 8

Die Infektivität der P1 und P7 Phagen in Abhängigkeit der von den Kn-Insertionen betroffenen Leserahmen *

Phage	Lage der Insertion	Plaquebildung auf S1652 oder CSH50
P1*Cm*cts100	-	+
P1/P7#2-13	19_c	-
P1*Cm*#6-2	19_c	-
P1*Cm*#6-5	19_c	-
P1/P7#1-15	19_v	-
P1/P7#2-6	19_v	-
P1*Cm*#5-2	19_v	-
P1*Cm*#5-80	19_v	-
P1*Cm*#5-50	19_v	-
P1*Cm*#5-122	19_v	-
P1/P7#2-22	tfs	-
P1*Cm*#5-9	tfs	-
P1*Cm*#5-108	tfs	-
P1*Cm*#5-21	tfs'	+
P1*Cm*#5-60	$19'_v$	+
P1*Cm*#5-11	$19'_v$	+
P1/P7#1-9	$19'_v$	+

* vgl. Abb. 9

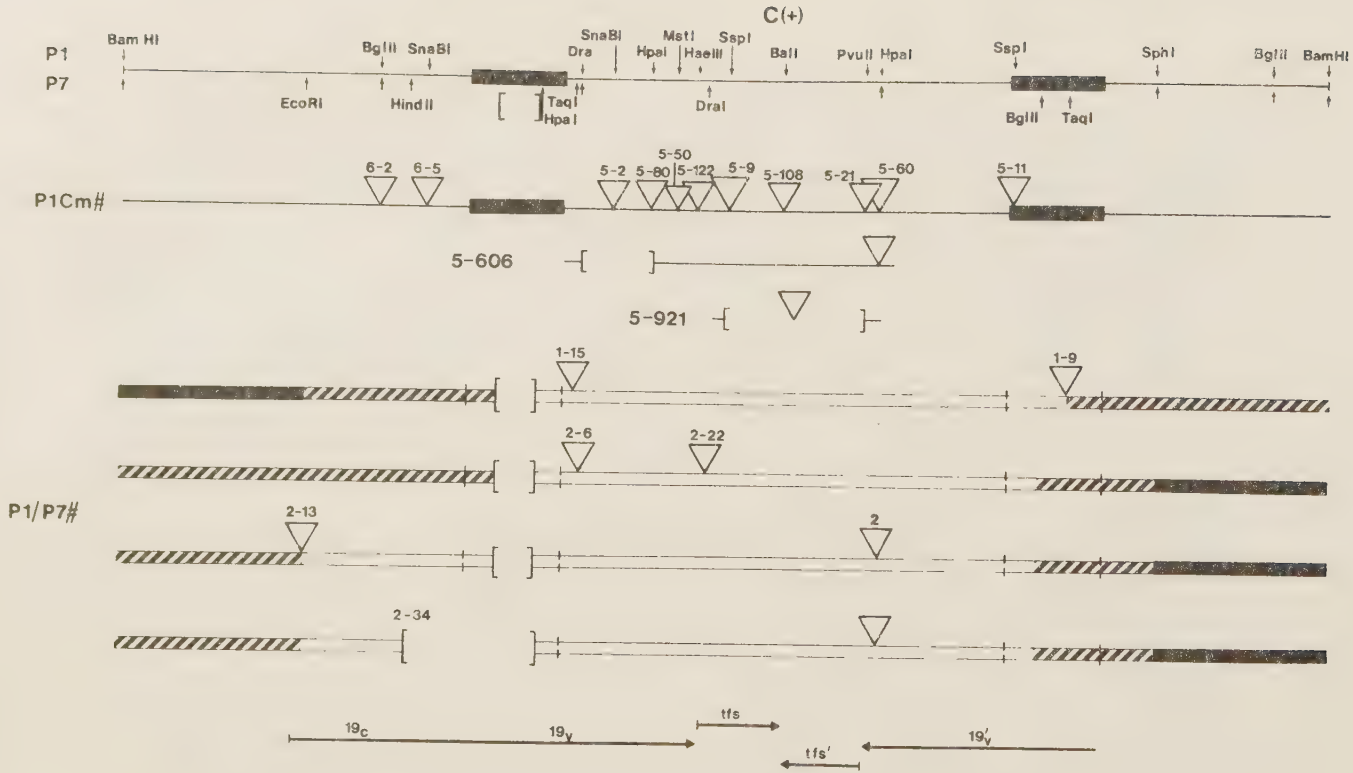


Abb. 9. Strukturen der verwendeten Phagenmutanten. Die relevanten Restriktionsschnitte für P1 und P7 sind durch Pfeile oberhalb bzw. unterhalb der Linie angezeigt. Deletionen im Vergleich mit P1 Wildtyp DNA sind durch Klammern, Kn-Insertionen durch Dreiecke dargestellt. Bei den P1/P7 Hybriden wurden diejenigen Bereiche, die eindeutig entweder P1 oder P7 zugeordnet werden können, durch dunkle bzw. helle Balken dargestellt; Bereiche, die sowohl von P1 als auch von P7 stammen könnten, wurden schraffiert gezeichnet.

2.1 Die Rezeptorbindungsstellen von Mu, P1 und P7

Durch die Untersuchung der Rezeptorspezifitäten von P1, P7 und Mu war eine Voraussetzung für die Charakterisierung der Rezeptorbindungsstelle innerhalb der Schwanzfasern dieser Phagen geschaffen worden. Die Abhängigkeit der Rezeptorbindung der Phagen von der Orientierung des invertierbaren Segments legte bereits nahe, daß sich die Rezeptorbindungsstellen innerhalb des G-Segments befinden, und Toussaint et al. (1978), die durch Rescue-Experimente an *amber* Mutanten von P1 und Mu zeigen konnten, daß die Wirtsbereiche beider Phagen wechselseitig austauschbar sind, waren aufgrund der Beobachtung, daß sich die einzig homologen Sequenzen zwischen diesen Phagen innerhalb des G-Segments befinden, zu derselben Schlußfolgerung gekommen. Hieraus ergibt sich als erste Arbeitshypothese für ein Modell der Schwanzfaser ein lineares Molekül, dessen COOH-terminaler Bereich die Rezeptorbindung zur Funktion hat, während für den NH_2-Terminus eine Wechselwirkung mit dem Phagenschwanz erwartet werden kann. Die Funktion des mittleren Teils des Schwanzfasermoleküls besteht dagegen im Aufbau und im Erhalt der Faserstruktur.

2.1.1 Austausch der Rezeptorbindungseigenschaften in Mu/P1 Hybridphagen.

Den einfachsten Ansatz zur Eingrenzung der Rezeptorbindungsstellen in den Phagen Mu und P1 bildet offensichtlich die Konstruktion von Mu/P1 Hybridphagen durch Kreuzungen innerhalb des homologen Bereichs der invertierbaren Segmente. Die geringste Ähnlichkeit zwischen Mu und P1 in diesem Bereich findet sich am COOH-Terminus der beiden Schwanzfasergene *S* bzw. *19*. Die Übereinstimmung der letzten

175bp beträgt hier nur noch gut 50% (s.a. Abb. 27). Wegen dieser starken Divergenz konnten in diesem Bereich auch die Rezeptorbindungsstellen für P1 und Mu vermutet werden. Ein Mu/P1 Hybrid mit dem Wirtsbereich von P1 war von Sandulache isoliert worden, doch zeigte eine Sequenzanalyse, daß dieser Hybridphage einen weitaus größeren Anteil des Gens *19* von P1 besitzt als die COOH-terminalen 400bp (Kamp et al., 1984; Sandulache, 1985). Um daher eine genauere Zuordnung der Rezeptorbindungsstelle zu ermöglichen, wurde das interne HpaI-Fragment im G-Segment des Phagen Mu *in vitro* durch das analoge Fragment von P1 ersetzt, wodurch die letzten 405bp des COOH-Terminus von *S* und das *U* Gen von Mu gegen P1 Sequenzen ausgetauscht wurden (Abb 10). Hierfür wurde zunächst das HpaI-Fragment in dem Mu Plasmid pGM1 deletiert und zum einen durch das Kn-Fragment aus pUC-4K (pGM1-25), zum anderen durch das entsprechende HpaI-Fragment von P1 aus pGP5-21 (Abb. 3), das eine zusätzliche Kn-Insertion in *tfs'* trägt, ersetzt (pGM1-21; Abb. 10). Die Substitutionsmutante pGM1-25 wurde dann in MucI62 gekreuzt, wobei die Isolierung der entsprechenden Phagenmutante, Mu-25, dadurch möglich wird, daß diese Rekombinante bei der Kreuzung durch MucI62 komplementiert wird und dadurch eine infektiöse Phagenhülle erhält. Sie kann folglich nach der Infektion als Kn^r Transduktante isoliert werden. Mu-25 wurde anschließend gegen das mit P1 DNA substituierte Plasmid pGM1-21 rückgekreuzt, und plaquebildende Rekombinanten wurden auf CSH50 und auf S1652, einem Wirt für Phagen mit dem Wirtsbereich von P1, selektioniert. Auf beiden Stämmen wurden mit nahezu gleicher Häufigkeit Plaques gebildet. Unabhängige Isolate solcher Rekombinanten von CSH50 (als Beispiel steht der Hybridphage Mu/P1-25/21-1) weisen alle den Wirtsbereich von P1 auf (Tab. 9 und 10), und dies zeigt eindeutig, daß die LPS-Bindungsstelle innerhalb der letzten 405bp bzw. 396bp der Schwanzfasergene *S* bzw. *19* und/oder den Genen *U* bzw. *tfs* lokalisiert sein muß. Da das HpaI-Fragment in Mu-25 deletiert ist, kann eine Rekombination zwischen

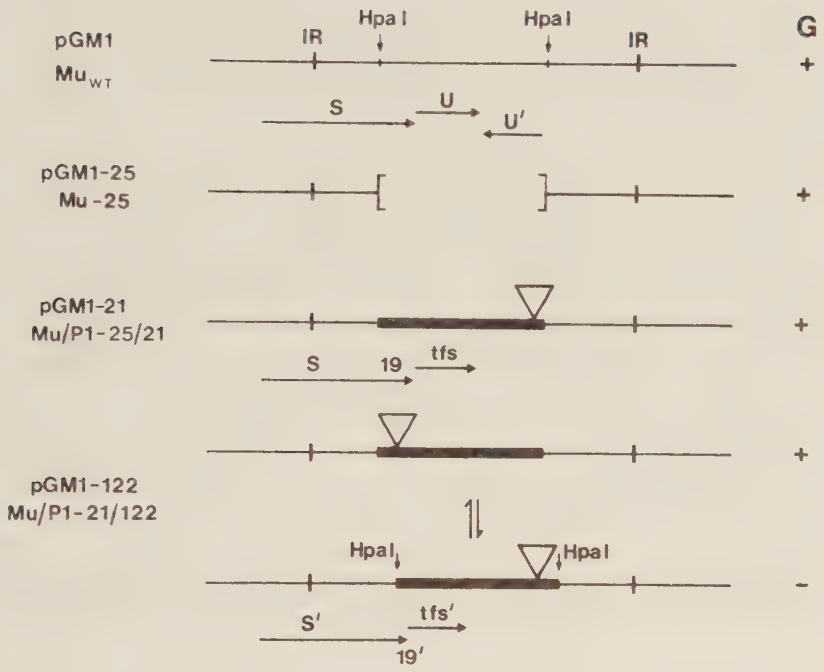


Abb. 10. Struktur der Plasmide pGM1, pGM1-25, pGM1-21 und pGM1-122 bzw. der entsprechenden Mu Phagen (siehe Text) mit den in den jeweiligen Orientierungen des G Segments exprimierten Schwanzfasergenen. Dicke Balken kennzeichnen die P1 DNA; Kn-Insertionen sind durch Dreiecke, Deletionen durch Klammern dargestellt.

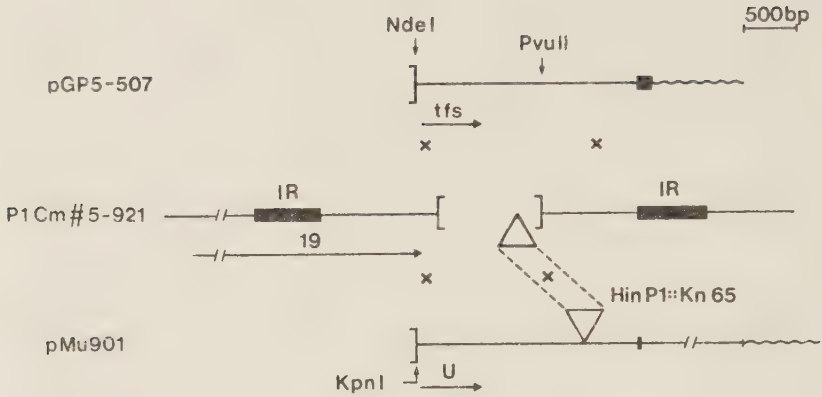


Abb. 11. Kreuzung von P1Cm#5-921 mit pGP5-507, pMu901 und pMu901 HinP1::Kn 65. Kreuze kennzeichnen die Bereiche der möglichen Crossover zwischen dem Phagen und den Plasmiden.

Phagen und Plasmid nur innerhalb von Sequenzen stattfinden, die von Mu stammen, womit gezeigt wird, daß sich die Rezeptorbindungsstelle von P1 an das *S* Gen von Mu anfügen läßt, ohne daß eine Anpassung der beiden Schwanzfaserkomponenten - z. B. durch zusätzliche Crossover in Bereichen geringerer Homologie - nötig wird. Dies ist dagegen bei einer normalen Hybridbildung zwischen den invertierbaren Segmenten von Mu und P1 nicht auszuschließen.
Wie bereits durch die Experimente von Sandulache et al. (1984) nahegelegt und durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt, unterscheiden sich die Phagen P1 und P7 geringfügig in ihrer Rezeptorbindung. Tatsächlich wurden nach Kreuzung von Mu-265, der ein Kn-Fragment in S_v' trägt (vgl. pMU901 HinP1::Kn 65, Abb. 11; Schmucker, 1986), mit dem P7 Plasmid pWR2C(+) (Abb. 3) Rekombinanten auf S1652 beobachtet, und der isolierte Hybridphage Mu/P7-265/2-3 plattierte ähnlich wie P7"C(+)" nur mit niedriger Effizienz auf C600 Mu^r#4 (Tab. 9 und 10). Hierdurch zeigt sich, daß auch der Wirtsbereich von P7 auf Mu übertragen werden kann. Die Rezeptorbindungsstelle von P7 war daher ebenfalls innerhalb der COOH-terminalen 130 Aminosäuren von Gen *19* oder in *tfs* zu erwarten.
Als ein Wirt für Mu*G(-)* Phagen war *E. Cloacae* identifiziert worden (Kamp, 1981). Sandulache (1985) beobachtete auf diesem Stamm durch P1 zwar die Transduktion von Antibiotika-Resistenzen, konnte jedoch keine Lysogenie oder Phagenvermehrung nachweisen. Auch zeigte P1 keine Affinität für gereinigtes LPS von *E. Cloacae*. In einem ähnlichen Experiment wie oben beschrieben wurde nun untersucht, ob die COOH-Termini von *S'* und *19'* für dieses unterschiedliche Verhalten verantwortlich zeichnen. Wiederum wurde das interne HpaI-Fragment des G-Segments in pGM1 substituiert, diesmal durch das HpaI-Fragment aus pGP5-122 (Abb. 10, vgl. Abb. 3). Das resultierende Plasmid, pGM1-122, besitzt die COOH-terminalen 35 Aminosäuren von *19'* sowie *tfs'*, während das hybride Schwanzfasergen aus *S* und *19* durch eine

Tabelle 9

Konstruktion von Mu/P1- und Mu/P7-Hybriden *

Kreuzung			Plaques/ml			Isolierte Rekombinante
Phage		Plasmid	CSH50	S1652	E. Cloacae	
Mu-25	x	pGM1-21	$2,4x10^4$	$4x10^4$	n.g.	Mu/P1-25/21-1
Mu/P1-25/21-1	x	pGM1-122	n.g.	n.g.	$7x10^1$	Mu/P1-21/122-1
Mu-265	x	pWR2C(+)	n.g	$3x10^2$	n.g.	Mu/P7-265/2-3

* Kreuzungen erfolgten wie beschrieben (s. Text). Zur Darstellung der Hybride s. Abb. 10. Rekombinante Phagen wurden als Plaques von CSH50 (Mu-25/21-1), E. Cloacae (Mu/P1-21/122-1) oder S1652 (Mu/P7-265/2-3) isoliert.

Tabelle 10

Relative Plattierungseffizienzen der Mu/P1- und Mu/P7-Hybride *

	CSH50	S1652	C600 Mu^r#4	E. Cloacae
MucI62	1	-	-	$4x10^{-3}$
Mu/P1-25/21-1	0,8	1,8	0,85	-
Mu/P7-265/2-3	1,6	3	$2,8x10^{-7}$	n.g.
Mu/P1-21/122-1	-	-	n.g.	$2x10^{-2}$

* Die relative Plattierungseffizienz der Phagen wurde bezogen auf die Anzahl der pfu/ml Lysat von MucI62 auf CSH50 ($2,5x10^9$). Gegeben sind die Ergebnisse eines Experiments. n.g.: nicht getestet. "-": Plattierungseffizienz $<4x10^{-8}$.

Kn-Insertion inaktiviert wird. Der COOH-Terminus von *19'* zeigt im Vergleich mit *S* einen Aminosäure-Austausch und weist an seinem Ende zwei zusätzliche Aminosäuren auf (Abb. 12b). Plasmid pGM1-122 wurde gegen den oben beschriebenen Hybridphagen Mu/P1-25/21-1 gekreuzt, und ein Rescue von *S'* wurde auf *E. Cloacae* getestet. Tatsächlich wurden Plaques auf *E. Cloacae* beobachtet, und der isolierte Kn^r Hybridphage Mu/P1-25/122-1 war erwartungsgemäß nicht in der Lage, auf S1652 oder CSH50, Wirten für Mu/P1-25/21-1, zu wachsen. Hierin zeigt sich, daß das unterschiedliche Verhalten von P1 und Mu auf *E. Cloacae* nicht in den COOH-terminalen 35 Aminosäuren oder in Tfs begründet ist. Da möglicherweise für eine Rezeptorerkennung ein größerer Bereich der Schwanzfaser als die letzten 35 Aminosäuren benötigt wird, kann nicht endgültig geklärt werden, ob für das fehlende Wachstum von P1 auf *E. Cloacae* eine schwache Rezeptorbindung oder ein Defekt in der Vermehrung der Phagen verantwortlich ist.

2.1.2 Die Rolle der Gene *tfs* und *tfs'* von P1 bzw. *U* und *U'* von Mu für den Wirtsbereich der Phagen

Ein Vergleich von *U* mit *U'* oder von *tfs* mit *tfs'* auf DNA-Ebene zeigt, daß diese Gene jeweils nur eine Übereinstimmung von knapp 60% aufweisen (Kamp et al., 1984). Man findet jedoch bei einer genaueren Analyse, daß diese Abweichungen hauptsächlich den COOH-Terminus betreffen, während der NH_2-Terminus zwischen den beiden Genen gut konserviert ist. Es erschien daher möglich, daß die Variabilität der COOH-Termini ähnlich wie in den Genen *S* und *19* einen Einfluß auf den Wirtsbereich der Phagen ausüben könnte.

Die im vorigen Abschnitt beschriebene Substitution des HpaI-Fragments in Mu/P1-25/21-1 zeigt bereits, daß das *tfs* Gen von P1 das *U* Gen von Mu funktionell ersetzen kann, zumindest dann, wenn wie in obigem Experiment neben *U* auch

Tabelle 11

Konstruktion von P1/Mu Hybriden in tfs und U *

	Plaques/ml		getestete	Hostrange	
	S1652	CSH50	Isolate	P1	Mu
P1Cm#5-921 x pGP5-507	$4,1 \times 10^5$	n.g.	-		
x pMU901 HinP1::Kn 65	5×10^1	4×10^1	2	2	-
x pMU901	$<10^1$	$<10^1$			
P1Cm#5-921/65	$7,5 \times 10^9$	5×10^9			

* Zur schematischen Darstellung der Konstruktion s. Abb. 11. P1Cm#5-921/65 wurde als Rekombinante auf CSH50 selektioniert und anschließend auf S1652 getestet (s. Text).

der COOH-Terminus des *S* Gens durch P1 substituiert wird. Dies beantwortet jedoch noch nicht die Frage nach einer eventuellen Bedeutung von *tfs* bzw. *U* für den Wirtsbereich der Phagen und läßt außerdem die Möglichkeit offen, daß ihre Genprodukte nur jeweils in Verbindung mit dem COOH-Terminus ihres natürlicherweise benachbarten *S* oder *19* Gens ihre Funktion ausüben. Um dies zu testen wurde der durch eine Deletion in *tfs* defekten Phage P1*Cm*#5-921 (Abb. 9) gegen die Plasmide pGP5-507, pMU901 und pMu901 HinP1::Kn 65 gekreuzt. Diese Plasmide tragen nahezu äquivalente Anteile der invertierbaren Segmente von P1 bzw. Mu, wobei die Gene *S* und *19* bis auf die COOH-terminalen 25bp in P1 bzw 27bp in Mu deletiert wurden (Abb. 11 und 12a). Plasmid pMU901 HinP1::Kn 65 trägt im Vergleich zu pMU901 zusätzlich eine Kn-Resistenz in *S'* (Schmucker, 1986). Ein Rescue von *tfs* durch *U* erzwingt eine Kreuzung innerhalb eines 200bp Bereichs zwischen dem KpnI-Schnitt in Mu und dem Beginn der Deletion in P1 an Position 4149 (Abb. 12a). Wegen der geringen Homologie der COOH-Termini von *S* und *19* muß dieses Crossover außerdem innerhalb des NH_2-Terminus von *U* und *tfs* stattfinden (Abb. 12a). Ein zweites Crossover kann dann hinter dem Deletionsendpunkt von P1 zwischen *S'* und *19'* erfolgen. Hierdurch wird gewährleistet, daß mindestens die COOH-terminalen 354bp von *tfs* - das entspricht 68% des Gens - durch *U* substituiert werden, während der COOH-Terminus von Gen *19* erhalten bleibt. Rescue von *tfs* in P1*Cm*#5-921 wurde auf CSH50 und S1652 getestet. Während das Kontrollexperiment mit pGP5-507 in hoher Zahl Rekombinanten zum Wildtyp lieferte, findet man mit pMU901 keine und mit pMU901 HinP1::Kn 65 nur wenige Plaques (Tab. 11). Alle getesteten Rekombinanten waren Kn^r, so daß das Crossover hinter der Deletion von P1 zwischen den Kn-Fragmenten von P1*Cm*#5-921 und pMU901 HinP1::Kn 65 stattgefunden haben muß (Abb. 11). Es ist daher anzunehmen, daß die Rekombination bevorzugt über die absolute Homologie der Resistenzgene und nicht zwischen *S'* und *19'* erfolgt. Die Ähnlichkeit zwischen den

```
                                        3920                  3940   NdeI   3960                  3980
                                                                  KpnI
P1 5'----GGCGATGATGACGCTATCTTCAGGCCGATACAAAAATACATCAATGGCATATGGTATAACGTCGCACAGGTGTAAATTATGCAGCACTTA
         || |||||  | | |    || | ||| | || ||  | |||| || |  |||||||| || ||     |  |  |||||  |||  |
Mu 5'----GGGGATGACAAGGTTTATATCCGTCCGGTTCAGAAGAATATCAACGGTACCTGGTATAATGTAGCGAGCGCCTG.ATTATGATGCATCTG
         GlyAspAspAspAlaIlePheArgProIleGlnLysTyrIleAsnGlyIleTrpTyrAsnValAlaGlnVal *    MetGlnHisLeu
                      LysValTyrIle      Val      Asn        Thr                SerAla *       Met
                                                                          S, 19                U, tfs
                                                                      ------------------->   |------

        4000                  4020                  4040                  4060                  4080                  4100
AAAAATATCAGGTCAGGAAACCCAAAGACAAAAGAGCAATACCAATTAACAAAAGATTTTGACGTAATCTGGTTGTGGTCTGAAGACGGAAAAAACTGGTATGAGGAAGTGAAAAACTTT
||||| || | ||||| ||| ||||| || |||||||||| ||  |||||||  |||||||  || |||||||| ||||| |||||||| |||||||||||||| ||||| || ||||||
AAAAACATTAAGTCAGAAAATCCAAAAACTAAAGAGCAATATCAGCTAACAAAGAATTTTGATGTTATCTGGTTATCGTCCGAAGACGGGAAAAACTGGTATGAAGAAGTAAATAACTTT
LysAsnIleArgSerGlyAsnProLysThrLysGluGlnTyrGlnLeuThrLysAspPheAspValIleTrpLeuTrpSerGluAspGlyLysAsnTrpTyrGluGluValLysAsnPhe
        Lys   Glu                                   Asn                                                                Asn

        4120                  4140                  4160                  4180                  4200                  4220
                                   921
                              SspI [
CGACCAGACACCATAAAGATTGTTTACGATGAAAATAATATTATTGTCGCCATCACCAAAGATGCCTCCACGCTTAACCCCGAAGGCTTTAGCGTCGTCGAGATTCCCGACATAACAGCC
|  |||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||| ||||||| |||||||||||||||||||| |||||||| || |||||||||
CAGGACGACACCATAAAGATTGTATACGACGAAAATAATATTATTGTTGCCATAACCAAAGATGCCTCAACGCTTAATCCCGAAGGCTTTAGCGTCGTTGAGATTCCAGATATAACAGCC
ArgProAspThrIleLysIleValTyrAspGluAsnAsnIleIleValAlaIleThrLysAspAlaSerThrLeuAsnProGluGlyPheSerValValGluIleProAspIleThrAla
GlnAsp

        4240                  4260                  4280                  4300                  4320                  4340
AACCGCCGCGCCGACGATTCAGGAAAGTGGATGTTTAAGGATGGAGCTGTAGTTAAACGGATTTATACGGCAGACGAACAGCAACAACAAGCCGAATCACAAAAGGCCGCATTGCTTTCC
||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AACCGCCGCGCTGATGATTCAGGAAAGTGGATGTTTAAGGATGGAGCTGTAGTTAAACGGATTTATACGGCAGACGAACAGCAACAACAAGCCGAATCACAAAAGGCCGCATTGCTTTCC
AsnArgArgAlaAspAspSerGlyLysTrpMetPheLysAspGlyAlaValValLysArgIleTyrThrAlaAspGluGlnGlnGlnGlnAlaGluSerGlnLysAlaAlaLeuLeuSer

        4360                  4380                  4400                  4420                  4440                  4460
GAAGCCGAATCAGTCATCCAGCCGCTGGAACGCGCTGTCAGGCCGAATATGGCAACAGACGAGGAACGCACACGACTGGAAGCATGGGAACGCTACAGTGTTCTGGTCAGCCGTGTGGAT
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||| || || ||||||||| |||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GAAGCTGAATCAGTCATCCAGCCGCTGGAACGCGCTGTCAGGCTGAATATGGCGACGGATGAGGAACGCGCACGACTGGAGTCATGGGAACGCTACAGTGTTCTGGTCAGCCGTGTGGAT
GluAlaGluSerValIleGlnProLeuGluArgAlaValArgProAsnMetAlaThrAspGluGluArgThrArgLeuGluAlaTrpGluArgTyrSerValLeuValSerArgValAsp
                                          Leu                                 Ala         Ser

        4480                  4500
ACGGCAAACCCGAATTGGCCACAAAAGCCTGAATAA
|||||||| ||  | ||||||||||||||||||||
ACGGCAAATCCCGAATGGCCACAAAAGCCTGAATAA
ThrAlaAsnProAsnTrpProGlnLysProGlu *
          Glu                     *
                 ------------------->
```

Abb. 12a. Sequenzvergleich der COOH-terminalen Enden der Gene 19 und S sowie der Gene tfs und U der Phagen P1 und Mu. Der Beginn der Deletion in P1Cm#5-921 ist durch eine Klammer gekennzeichnet. Die Nummerierung entspricht der bekannten P1 Sequenz.

```
                                                P1 5'----GGTTCAGTTAACGGGAACCGTGATGAATTAATTGATACAACACAGGCAAGGCCAATCCGGTATTGCATTAATGGAACGTGG
                                                         ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                                Mu 5'----GGTTCAGTTAACGGGAAACCGTGATGAATTAATTGATACAACTCAGGCAAGGCCAATTCAGTATTGCATTAATGGAACGTGG
                                                         GlySerValAsnGlyAsnArgAspGluLeuIleAspThrThrGlnAlaArgProIleArgTyrCysIleAsnGlyThrTrp
                                                                                                                                        Gln

                 5070                 5050                 5030                 5010                 4990

TATAACGCGGGGAGTATTCAATTATGATGCACTCAAGAAATATTACAGCTGGCAACCCTAAAACAAAAGAGCAATACCAGCTAACGAAACAATTTAACATCGAATGGCTTTATACAGAG
||||||||||||||||| ||||||||||||| || ||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TATAACGCGGGGAGTATTTAATTATGATGCACTTAAAAAATATTACTGCTGGCAACCCTAAAACAAAAGAGCAATACCAGCTAACGAAACAATTTAACATCAAATGGCTTTATACAGAG
      S' 19'          MetMetHisSerArgAsnIleThrAlaGlyAsnProLysThrLysGluGlnTyrGlnLeuThrLysGlnPheAsnIleGluTrpLeuTyrThrGlu
                                  LeuLys                                                                                Lys
TyrAsnAlaGlySerIleGlnLeu *                U'tfs'
                         *

                 4970                 4950                 4930                 4910                 4890

GATGGAAAAAACTGGTATGAGGAACAAAGAAATTTCCGATATGATACGTTGAAAATGGCCTATGACCACAACGACGTTATT...TGTATTGAAAAGGATGTTTCAGCAATTAATCCAGAA
||||| |||||||||||||||||||||  || || |    |||||||||||||||| |||||||    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GATGGGAAAAACTGGTATGAGGAACAAAAGAACTTTCAGCCTGATACGTTGAAAATGGTCTATGACCACAACGGCGTTATTATTTGTATTGAAAAGGATGTTTCAGCAATTAATCCAGAA
AspGlyLysAsnTrpTyrGluGluGlnArgAsnPheArgTyrAspThrLeuLysMetAlaTyrAspHisAsnAspValIle - CysIleGluLysAspValSerAlaIleAsnProGlu
                            Arg      GlnTyr                                  Gly      Ile

4870                 4850                 4830                 4810                 4790                 4770

GGCGCAAGCGTCGTTGAATTACCTGATATTACAGCAAATCGCCGGGCTGATATTTCGGGTAAATGGTGGATGTTCAAAGATGGTGTAGTGATAAAGCGAACTTATACCGAGGAAGAGCAG
||||||||||||||||  | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GGCGCAAACGTCGTTGAGGTTCCTGATATTACAGCAAATCGCCGGGCTGATATTTCGGGTAAATGG...ATGTTCAAAGATGGTGTAGTGATAAAGCGAACTTATACCGAGGAAGAGCAG
GlyAlaSerValValGluLeuProAspIleThrAlaAsnArgArgAlaAspIleSerGlyLysTrpTrpMetPheLysAspGlyValValIleLysArgThrTyrThrGluGluGluGln
      Asn          ValPro                                          -

4750                 4730                 4710                 4690                 4670                 4650

AGGCAACAAGCGGAAAATGAAAAGCAAAGCCTGCTACAGCTCGTCAGGGATAAAACCCAGCTATGGGACTCACAGCTACGGTTGGGTATCATTTCCGCCGTGAATAAGCAGAAATTAACC
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AGGCAACAAGCGGAAAATGAAAAGCAAAGCCTGCTACAGCTCGTCAGGGATAAAACACAGCTATGGGACTCACAGCTACGGCTGGGCATCATTTCCGACGAGAATAAACAAAAATTAACA
ArgGlnGlnAlaGluAsnGluLysGlnSerLeuLeuGlnLeuValArgAspLysThrGlnLeuTrpAspSerGlnLeuArgLeuGlyIleIleSerAlaValAsnLysGlnLysLeuThr
                                                                                                                  AspVal

4630                 4610                 4590                 4570                 4550                 4530

GAGTGGATGCTCTTTGCGCAGAAAGTCGAATCCACAGACACCTCCAGCCTACCAGTAACATTTCCCGAACAACCCGAACGAGACAGGCCCGATAGCGGGCCTTAA
||||||||||||  |||||||| |||||||||||||||||||||||||||| |||||||| ||||| |||||||| ||| |||| | | ||        || | | |
GAGTGGATGCTCTACGCGCAGAAGGTCGAATCCACAGACACCTCCAGCCTGCCAGTAACGTTTCCAGAACAACCAGAATGAGAGAAGGCCCGCTATCGGGCCTTA
GluTrpMetLeuPheAlaGlnLysValGluSerThrAspThrSerSerLeuProValThrPheProGluGlnProGluArgAspArgProAspSerGlyPro *
            Tyr                                                                                   *
                                                                                  ----------> U'      ----------> tfs'
```

Abb. 12b. Sequenzvergleich der COOH-terminalen Enden der Gene 19' und S' sowie der Gene tfs' und U' der Phagen P1 und Mu. Die Nummerierung entspricht der bekannten P1 Sequenz (Kardas, 1984).

NH_2-Termini von *tfs* und *U* ist mit 81% relativ gering (vgl. Abb 12a), so daß hier im Vergleich mit P1 relativ niedrige Rekombinationsfrequenzen zu erwarten sind. Unabhängig voneinander von CSH50 isolierte Rekombinanten wie P1*Cm*#5-921/65 plattierten sämtlich mit ähnlicher Effizienz auf S1652 (Tab. 11) und zeigten damit, daß zumindest die COOH-terminalen zwei Drittel von *tfs* und *U* austauschbar sind, ohne daß die Infektivität oder der Wirtsbereich der Phagen beeinflußt wird. Obwohl aufgrund dieser Ergebnisse die Determinanten des Wirtsbereichs ziemlich eindeutig in den COOH-Termini von 19 und S lokalisiert werden können, ist es nicht vollkommen auszuschließen, daß Aminosäure-Austausche im NH_2-Terminus von Tfs und U die spezifische Wechselwirkung mit 19 bzw. S beeinflussen, so daß man bei einer Kreuzung auf Crossover selektioniert, die eine solche Wechselwirkung noch erlauben.

Das hypothetische Gen *tfs'* unterscheidet sich von *U'* neben einigen Aminosäure-Austauschen hauptsächlich an seinem COOH-Terminus, der in *tfs'* für acht zusätzliche Aminosäuren codiert (Abb. 12b). Die Konstruktion des Hybridphagen Mu/P1-25/122-1, in dem *U'* von Mu vollständig durch *tfs'* substituiert wurde (Abb. 10), zeigt, daß die Divergenz der beiden Gene für ihre Austauschbarkeit bedeutungslos ist und die Funktion der Schwanzfaser hierdurch nicht beeinträchtigt wird. Für die Unfähigkeit von P1*C(-)cin*$^-$ auf *E. Cloacae* zu wachsen kann demnach eine Spezifitätsänderung durch *tfs'* ausgeschlossen werden. Der COOH-Terminus zeigt sich also wie schon zwischen *U* und *U'* bzw. *tfs* und *tfs'* auch zwischen *tfs'* und *U'* als relativ flexibel, während der NH_2-Terminus in seiner Sequenz stärker konserviert bleibt. Diese Beobachtungen werden auch durch die späteren Experimente der Linkermutagenese bestärkt (2.2.3).

2.1.3 Eigenschaften von Hybridphagen

Nach den Kreuzungsexperimenten von Mu mit P1 konnte die Rezeptorbindungsstelle dieser Phagen bereits innerhalb der letzten 130 Aminosäuren der Schwanzfaser lokalisiert werden. Die Phagen P1 und P7 bieten wegen ihrer weitgehenden Homologie jedoch weit mehr Möglichkeiten zur Hybridbildung als P1 und Mu, so daß von einer Charakterisierung solcher Hybride nicht nur weitere Informationen über die Rezeptorbindungsstellen, sondern auch über strukturelle Einflüsse von Bereichen außerhalb der G-Segment Homologie zu erwarten waren. Der erste P1/P7 Hybridphage, P1/P7#1-9, zeigte bereits, daß durch den Austausch der invertierbaren Segmente auch die Wirtsspezifität von P7 auf P1 übertragen wird. Mit Hilfe der Insertions- und Deletionsmutanten von P1 und P7 wurden nun weitere Hybridphagen mit definierten Sequenzaustauschen konstruiert. Hierzu wurden in heterologen Rescue-Experimenten Phagen mit defekten Schwanzfasern von P1 oder P7 mit Plasmiden gekreuzt, die die intakten Sequenzen des jeweils anderen Phagen enthielten. Ein Rescue defekter Phagen sollte sich in plaquebildenden Rekombinanten auf S1652 zeigen, da sowohl P1 wie P7 auf diesem Stamm plattieren. Bei einem Austausch der für die LPS-Erkennung verantwortlichen Regionen von P1 durch P7 sollten die auf diese Weise selektionierten Hybridphagen auf C600 Mu^r#4 keine Plaques mehr bilden. Umgekehrt waren bei einem Rescue defekter P7 Phagen durch P1 bei gleichzeitigem Austausch der LPS-Bindungsstellen Phagenpartikel zu erwarten, die sowohl auf S1652 als auch auf C600 Mu^r#4 Plaques bilden (Tab. 12). Alle Kreuzungsexperimente wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Durch die geeignete Wahl der Kreuzungspartner und der Selektionsbedingungen konnten die Bereiche für die Crossover zwischen P1 und P7 stark eingeschränkt werden. Eine genauere Kartierung der Hybridphagen erfolgte wenn nötig mit Hilfe der RFLPs in den Schwanzfasergenen von P1 und P7 (vgl. Abb. 13, 14 und 16).

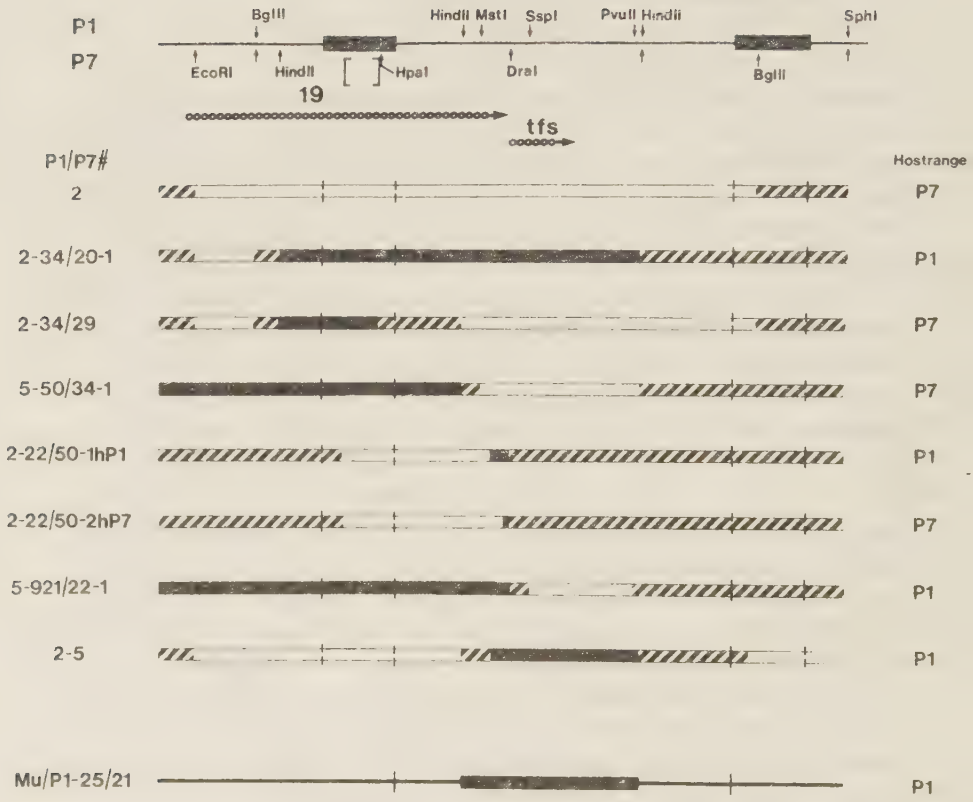


Abb. 13. Struktur und Wirtsbereich der zur Eingrenzung der Rezeptorbindungsstellen konstruierten P1/P7 und Mu/P1 Hybride. Zur zeichnerischen Darstellung der Hybride vgl. Abb. 9.

2.1.3.1 Der COOH-Terminus von Gen *19* enthält die Rezeptorspezifität

Zur funktionellen Analyse des COOH-Terminus von Gen *19* wurde der durch eine Kn-Insertion im variablen Teil der Schwanzfaser defekte Phage P1*Cm*#5-50 gegen pWR2-34 gekreuzt (Abb. 14a, Tab. 12). Die gleichzeitige Selektion der Rekombinanten auf Plaquebildung auf S1652 und auf Kn^r erfordert, daß das erste Crossover zwischen dem Ende der Deletion in pWR2-34 und der Kn-Insertion in P1*Cm*#5-50, das zweite hinter der Kn-Insertion in pWR2-34 erfolgt, so daß mindestens der Bereich zwischen den beiden Kn-Insertionen von P1 und P7 ausgetauscht werden muß. Durch genauere Kartierung der Kreuzungsprodukte mit HindII konnte der Hybridphage P1/P7#5-50/34-1 isoliert werden, in dem beide HindII-Schnittstellen aus P1 erhalten geblieben waren (Abb. 13), so daß maximal 396bp des COOH-Terminus dieser hybriden Schwanzfaser von P7 stammen können. Dieses Hybrid besitzt den Wirtsbereich von P7, bildet jedoch, wie bereits in 1.2.1 beschrieben, mit niedriger Frequenz Plaques auf C600 Mu^r#4. Die Isolierung eines dieser plaquebildenden Phagen, P1/P7#5-50/34-1hP1, zeigt, daß es sich hierbei um Hostrange-Mutanten von P7 mit dem Wirtsbereich von P1*Cm*cts100 handelt (vgl. Tab. 5).
In einem ähnlichen Experiment wurde der COOH-Terminus des P7 Schwanzfasergens gegen denjenigen von P1 ausgetauscht. Hierfür wurde der durch eine Kn-Insertion im NH_2-Terminus von *tfs* defekte Phage P1/P7#2-22 gegen pGP5-50 gekreuzt (Abb. 14b, vgl. Abb. 3 und 9). Das Crossover, das zu einem restaurierten Schwanzfasergen führt, ist nur innerhalb des von den zwei Kn-Insertionen in P1/P7#2-22 und pGP5-50 begrenzten Bereichs möglich, der die 227 COOH-terminalen Nukleotide von Gen *19* umfaßt (vgl. Abb. 16). Zwei Typen rekombinanter Kn^s Phagen wurden auf S1652 isoliert. Typ I entspricht in seinem Verhalten P1 Wildtyp und plattiert mit gleicher Effizienz auf S1652 und C600 Mu^r#4, Typ II hat den

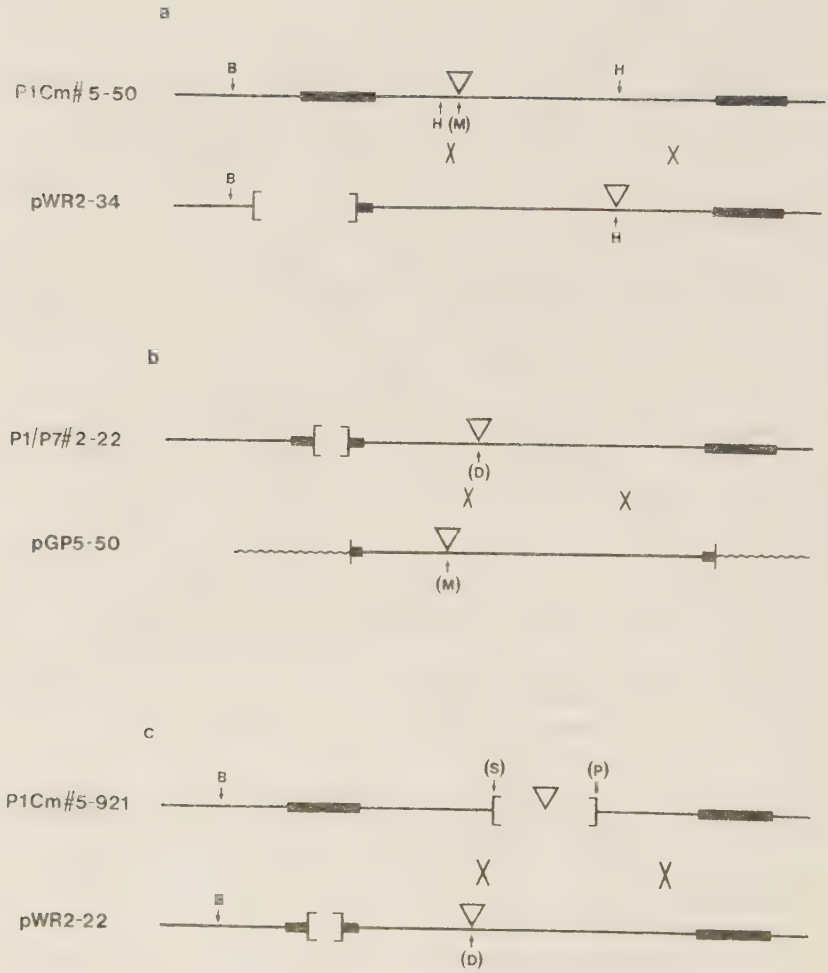


Abb. 14a-c. Kreuzungen zwischen P1 und P7 zur Eingrenzung der Rezeptorbindungsstellen. B: BglII; D: DraI; H: HindII; M; MstI; P: PvuII; S: SspI. Restriktionsschnitte, die durch Kn-Insertionen (▽) zerstört wurden, stehen in Klammern. Kreuze symbolisieren die Crossover (vgl. Text).

Tabelle 12

Konstruktion von P1/P7 Hybridphagen zur Lokalisierung der LPS-Bindungsstelle *

Kreuzung			Plaques/ml		Phagenisolat und Selektionsmarker		getestete Isolate	Hostrange	
Phage	x	Plasmid	S1652	C600 Mu^r#4				P1	P7
P1/P7#2-34	x	pGP1-1/29	$5x10^1$	$<10^1$	P1/P7#2-34/29	(Cm^rKn^r)	2	-	2
P1/P7#2-34	x	pGP1-1/20	$2,5x10^2$	$4x10^1$	P1/P7#2-34/20-1	(Cm^rKn^s)	2	2	-
P1/P7#2-34	x	pWR2C(+)	$2,3x10^5$	$<10^1$	P1/P7#2	(Cm^rKn^r)	2	-	2
P1Cm#5-50	x	pWR2-34	$5,1x10^2$	$<10^1$	P1/P7#5-50/34-1	(Cm^rKn^r)	2	-	2
P1/P7#2-22	x	pGP5-50	$1,3x10^2$	$1,1x10^2$	P1/P7#2-22/50-1hP1 P1/P7#2-22/50-2hP7	(Cm^rKn^s) (Cm^rKn^r)	10	7	3
P1Cm#5-921	x	pWR2-22	$5,1x10^3$	$1,2x10^2$	P1/P7#5-921/22-1	(Cm^rKn^s)	6	6	-
P1/P7#2			$4,5x10^9$	$5x10^1$					
P1/P7#2	x	pGP5	$4,5x10^9$	$1,4x10^3$	P1/P7#2-5	(Cm^rKn^s)	1	1	-

* Kreuzungen erfolgten wie in Material und Methoden 5.4. beschrieben (vgl. auch Text) Rekombinante Phagen wurden als Plaques von S1652 isoliert. Eine Ausnahme bildete das Kreuzungsprodukt zwischen P1/P7#2 und pGP5, das von C600 Mu^r#4 isoliert wurde.

Wirtsbereich von P7 und plattiert auf C600 Mu^r#4 mit einer Effizienz von 10^{-7}. Beispielhaft für Hybride von Typ I und II, die ungefähr in einem Verhältnis von 2:1 auftreten, stehen die Phagen P1/P7#2-22/50-1hP1 und P1/P7#2-22/50-2hP7 (Abb. 13, Tab. 5 und 12). Bereits diese Experimente lassen erwarten, daß Unterschiede innerhalb der letzten 227bp von Gen *19* für die verschiedenartige Rezeptorspezifität von P1 und P7 verantwortlich sind. Ähnlich wie bei den Kreuzungsexperimenten zwischen Mu und P1 werden jedoch auch hier die sich an das Gen *19* anschließenden Sequenzen des *tfs* Gens zwischen P7 und P1 übertragen. Um den Einfluß dieses Gens auf den Wirtsbereich zu untersuchen, wurde P1*Cm*#5-921 gegen pWR2-22 gekreuzt. Das Crossover wird hierbei zwischen der Kn-Insertion im NH_2-Terminus von *tfs* in pWR2-22 und der Deletion in P1*Cm*#5-921, also innerhalb der NH_2-terminalen 171bp des *tfs* Gens erzwungen, wobei der COOH-Terminus von Gen *19* unbeeinflußt bleibt (Abb. 14c, vgl. Abb. 12a und 15). Plaquebildende Rekombinanten wurden auf S1652 und auf C600 Mu^r#4 beobachtet. Unabhängige von S1652 isolierte Rekombinanten, für die exemplarisch der Hybridphage P1/P7#5-921/22-1 steht (Abb. 13, Tab. 5), zeigen ausnahmslos den Wirtsbereich von P1. Wenngleich auch eine Rolle des NH_2-Terminus wiederum nicht vollständig auszuschließen ist, so bekräftigen diese Experimente doch im wesentlichen die Hypothese, daß der COOH-Terminus des Schwanzfasergens *19* den Träger der Wirtsspezifität darstellt.

```
                                3760                    3780
                                  .                       .
P7  5'--CTCGCAAGTTATTCCTGGCAACTATGGCAATTTTGATTCCAGA
          ||||| ||||||| || || ||||||||||||| ||  |
P1  5'--TGCGCAAATTATTCCCGGAAATTATGGCAATTTTGACTCGCGC
        ___|___  ValIleProGlyAsnTyrGlyAsnPheAspSerArg
        MstI     Ile

      3800                    3820                    3840
        .                       .                       .
TATGTGAGAGATGTTCGCCTGGGTACGCGAGTTGTTCAATTGATGGCGCGTGGTGGTCGT
||||||||||||| || || || || || ||||||| ||||||||||||| || |||
TATGTGAGAGATGTCCGACTTGGCACACGTGTTGTTCGATTGATGGCGCGTGGAGGGCGT
TyrValArgAspValArgLeuGlyThrArgValValGlnLeuMetAlaArgGlyGlyArg
                                          Arg

      3860                    3880                    3900
        .                       .                       .
TATGAAAAAGCCGGACACGCAATTACCGGATTAAGAATCATTGGTGAAGTAGATGGCGAT
||||||| | |||||||||| |||||||||||| || |||||||||| |||||||||
TATGAAAGAACCGGACACGCACTTACCGGATTAAGGATTATTGGTGAAGTTGATGGCGAT
TyrGluLysAlaGlyHisAlaIleThrGlyLeuArgIleIleGlyGluValAspGlyAsp
      ArgThr          Leu

      3920                    3940                    3960
        .                       .                       .
GATGAAGCCATCTTCAGGCCAATACAAAAATACATCAATGGCACATGGTATAACGTCGCA
||||| || |||||||||| |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
GATGACGCTATCTTCAGGCCGATACAAAAATACATCAATGGCATATGGTATAACGTCGCA
AspGluAlaIlePheArgProIleGlnLysTyrIleAsnGlyThrTrpTyrAsnValAla
   Asp                                          Ile

      3980              DraI
        .                 |
CAGGTGTAAATGATGCAGCATTTAAA---
||||||||||| |||||||| |||||
CAGGTGTAAATTATGCAGCACTTAAA---
GlnVal *    MetGlnHisLeu
 19 ------>   tfs ---------->
```

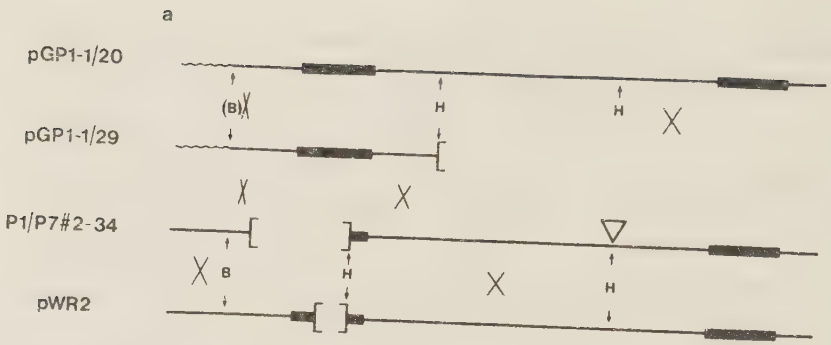
Abb. 15. Sequenzvergleich der Rezeptorbindungsstellen von P1 und P7. Die Nummerierung erfolgte entsprechend der bekannten P1 Sequenz (Kardas, 1984).

Der COOH-Terminus des Schwanzfasergens von P7 wurde sequenziert und mit der bekannten Sequenz des Phagen P1 verglichen. Das hierfür verwendete Plasmid pWR1-40 und das Sequenzierungsschema sind in Abb. 4 dargestellt.
Der Sequenzvergleich mit P1 zeigt sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene eine Übereinstimmung von ungefähr 90% (Abb. 15). Man findet 7 Aminosäure-Austausche, von denen vier als neutral zu betrachten sind (Val-Ile, Lys-Arg, Ile-Leu und Glu-Asp). In zwei Fällen werden Aminosäuren mit polaren Resten gegen solche mit unpolaren Resten ausgetauscht (Ala-Thr und Thr-Ile), und nur einmal erfolgt ein Austausch einer neutralen gegen eine basische Aminosäure (Gln-Arg). Auf Grund ihrer Lage und wegen der Verschiedenartigkeit der ausgetauschten Aminosäuren erscheinen zunächst die vier Austausche Gln-Arg, Ala-Thr, Lys-Arg und Thr-Ile am bedeutsamsten. Unter der Annahme, daß für die Rekombination zwischen P1/P7#2-22 und pGP5-50 kein "hotspot" existiert, spricht das Verhältnis 2:1 von Typ I zu Typ II Rekombinanten jedoch dafür, daß sich die für den Wirtsbereich verantwortlichen Aminosäure-Austausche innerhalb der letzten 30 Aminosäuren von 19 befinden. Jede dieser Substitutionen kann durch eine einzige Punktmutation hervorgerufen werden, und die spontane Bildung von Mutanten von P7, die den Wirtsbereich von P1 annehmen, spricht dafür, daß eine von ihnen für die veränderte Rezeptorerkennung der Phagen verantwortlich zeichnet. Um den Einfluß einzelner Aminosäure-Austausche mit Sicherheit bestimmen zu können, ist jedoch die Sequenzierung mehrerer Hybridphagen und eine sequenzspezifische Mutagenese zur Veränderung einzelner Aminosäuren erforderlich.

2.1.3.2 Der Austausch von NH_2-Terminus und IR des Schwanzfasergens beeinträchtigt die Rezeptorbindung nicht

Im Gegensatz zu Mu und P1 besteht zwischen P1 und P7 wegen deren weitgehender Homolgie die Möglichkeit, auch Bereiche der Schwanzfasergene außerhalb der mit dem G-Segment von Mu identischen Region auszutauschen. Da es die beträchtlichen Sequenzunterschiede zwischen den IRs von P1 und P7 nicht ausgeschlossen erscheinen ließen, daß Unterschiede der Schwanzfasern in diesem Bereich durch strukturelle Veränderungen ebenfalls Einfluß auf die Rezeptoraffinitäten nehmen könnten, wurden in einem weiteren Experiment gezielt die IRs von P1 und P7 gegeneinander ausgetauscht. Der Phage P1/P7#2-34, der eine 606bp-Deletion innerhalb des Schwanzfasergens von P7 trägt (Abb. 9), die, wie in einem späteren Abschnitt beschrieben, zu einem weitgehenden Defekt der Schwanzfaser und somit zu nichtinfektiösen Phagenpartikeln führt, wurde hierfür mit dem P1 Plasmid pGP1-1/29 und als Kontrolle mit pGP1-1/20 und dem P7 Plasmid pWR2 gekreuzt (Abb. 16a). Rekombinanten wurden als Plaques auf S1652 selektioniert. Hybridphagen wie P1/P7#2-34/29, die aus der Kreuzung mit pGP1-1/29 hervorgegangen waren und die nunmehr den NH_2- und den COOH-Terminus von *19*(P7) sowie den IR von *19*(P1) tragen, plattierten mit einer Effizienz von ungefähr 1 auf S1652, jedoch nur mit niedriger Frequenz auf C600 Mu^r#4, besitzen also den Wirtsbereich von P7. (Abb. 13, Tab. 5 und 12). Dasselbe Ergebnis lieferte erwartungsgemäß die Kontrolle mit pWR2, in der das Gen *19* von P7 vollständig restauriert wird, wogegen Rekombinanten aus der Kreuzung mit pGP1-1/20, die als Kn^s Phagen auf S1652 isoliert wurden und IR und COOH-Terminus von *19*(P1) tragen, sämtlich den Wirtsbereich von P1 besaßen. Als Beispiele stehen hier die Phagen P1/P7#2 bzw. P1/P7#2-34/20-1 (Abb. 13, Tab. 5 und 12).

Eine Kreuzung zwischen P1/P7#2, der im Gegensatz zu dem



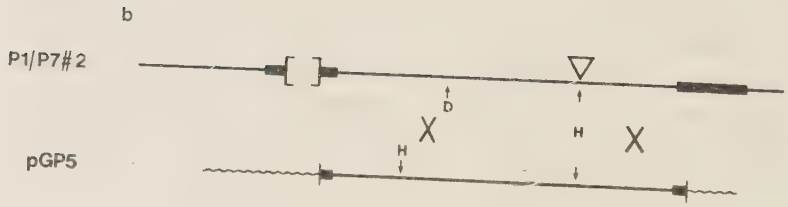


Abb. 16a,b. Kreuzungen zwischen P1 und P7 zur Eingrenzung der Rezeptorbindungsstellen. B: BglII; D: DraI; H: HindII. Der BglII-Schnitt in 19c von P1 ist in pGP1-1/20 und pGP1-1/29 durch die Ligation mit dem BamHI-Schnitt aus pBR322 zerstört. Die Kn-Insertionen sind durch Dreiecke angezeigt, Kreuze symbolisieren die Crossover (vgl. Text).

weiter oben beschriebenen Hybridphagen P1/P7#2-22 ein komplettes Schwanzfasergen *19* von P7 besitzt, und dem P1 Plasmid pGP5 wurde durchgeführt, um zu zeigen, daß auch der NH_2-Terminus von P7 keinen Einfluß auf die Rezeptorbindung nimmt (Abb. 16b). Diese Kontrolle erschien sinnvoll, da das Verhalten von P7*c*1.9, mit dem keine Hostrange-Mutanten auf C600 Mu^r#4 isoliert werden konnten, einen Einfluß NH_2-terminaler Sequenzen möglich erscheinen ließ. Rekombinanten zwischen P1/P7#2 und pGP5 mußten in diesem Fall auf C600 Mu^r#4 selektioniert werden, da P1/P7#2 nicht defekt ist und daher auf S1652 bereits Plaques bildet. Auch auf C600 Mu^r#4 bildet P1/P7#2 zwar einige Plaques - bereits dies spricht gegen einen Einfluß des NH_2-Terminus - die Zahl der Plaques bei einer Kreuzung mit pGP5 ist jedoch deutlich höher (Tab. 12). Die anschließende Selektion solcher plaquebildenden Partikel auf Kn^s stellte sicher, daß es sich bei den isolierten Phagen tatsächlich um Hybride und nicht um Hostrange-Mutanten handelte. Einer von acht auf C600 Mu^r#4 isolierten plaquebildenden Phagen (P1/P7#2-5) hatte die Fähigkeit zur Kn-Transduktion verloren, ein Beweis für ein doppeltes Crossover innerhalb des C-Segments. Da eine Restriktionsanalyse mit HindII und DraI zeigte, daß die für P1 charakteristischen HindII-Schnitte innerhalb des invertierbaren Segments dieses Hybrids ebenso fehlen, wie der für P7 charakteristische DraI-Schnitt im NH_2-Terminus des *tfs* Gens, muß das Crossover, das den Austausch der Rezeptorbindungsstellen bewirkte, wie erwartet in dem Bereich zwischen HindII- und DraI-Schnittstelle erfolgt sein, während ein zweites Crossover hinter der Kn-Insertion stattgefunden haben muß (Abb. 13 und 16b). Dies deckt sich mit den in Abschnitt 2.1.3.1 beschriebenen Experimenten, so daß auch diese Ergebnissen das Modell bestätigen, wonach der COOH-Terminus von Gen *19* die Spezifität der Rezeptorbindung in den Phagen P1 und P7 bestimmt, während andere Bereiche des Schwanzfasergens hierfür keine Rolle spielen.

2.1.3.3 Hybride zwischen den Genen *19* und *19'* sind defekt

Die Rezeptorspezifitäten der Phagen P1 und P7 konnten ungefähr im Bereich der COOH-terminalen 75 Aminosäuren von Gen *19* lokalisiert werden, und ein entsprechender Aufbau durfte auch für *19'* erwartet werden. Die Voraussetzungen für einen Versuch, die Bindungsspezifitäten der Schwanzfaser durch eine *in vitro* Neukombination von Strukturen bekannter Spezifität zu verändern, sind in P1 besonders günstig, da in diesem Fall die Spezifitäten von *19* und *19'* gegeneinander ausgetauscht werden könnten. Man bleibt hierbei im gleichen System und verwendet nur Sequenzen und Strukturen, die bereits im Phagen vorkommen und grundsätzlich von seinen Funktionen erkannt werden müßten. In den Mutanten pGP5-122 und pGP5-125 (Abb. 3) wurde das HpaI-Fragment innerhalb des C-Segments invertiert und so die Plasmide pGP5-122/5 bzw. pGP5-125/17 konstruiert, in denen die COOH-Termini der Schwanzfasern ausgetauscht sind, ohne daß dadurch der Leserahmen des Gens zerstört wurde. Durch die Kn-Insertionen innerhalb des invertierbaren Segments wird in jeweils einer Orientierung die Expression der Schwanzfaser blockiert (Abb. 22). Gen *19* wird durch die Fusion mit dem COOH-Terminus von *19'* um 101 Aminosäuren verkürzt, während *19'* durch den COOH-Terminus von *19* um dieselbe Anzahl verlängert wird. Zusammen mit den COOH-Termini der Schwanzfasern wurden jeweils die den beiden Orientierungen zugehörigen Gene *tfs* und *tfs'* ausgetauscht (Abb. 17). Beide Konstrukte wurden in P1Cm*c*ts100 gekreuzt, und die korrekte Insertion des HpaI-Fragments in den rekombinanten Phagen P1*Cm*#5-122/5 und P1*Cm*#5-125/17 wurde durch Restriktionsanalysen bestätigt. In beiden Fällen wurde keine Infektivität der Phagen festgestellt. Auch in Serumblockingtests mit einem gegen Mu*G(+)* Phagen gerichteten Antiserum, das mit P1*C(+)* kreuzreagiert und daher gegen die Schwanzfasern der Phagen gerichtet sein muß (Sandulache, 1985), wurde keine

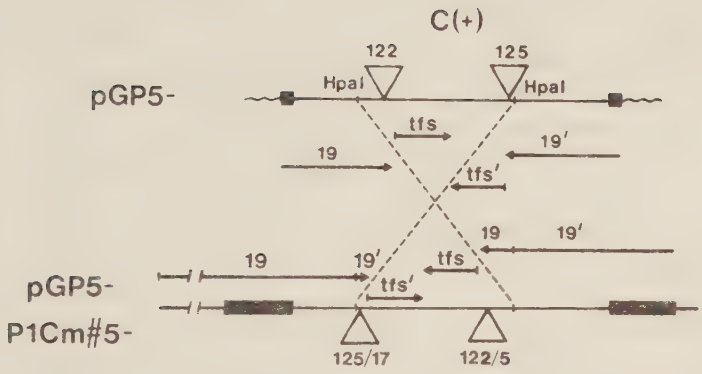


Abb. 17. Konstruktion und Struktur der Phagen P1Cm#5-122/5 und P1Cm#5-125/17 ausgehend von den Plasmiden pGP5-122 bzw. pGP5-125 (vgl. Text). Dreiecke kennzeichnen wiederum die Position der Kn-Insertionen.

neutralisierende Wirkung der Phagen beobachtet (Tab. 14). Die Ursache für den Defekt dieser Hybride ist nicht eindeutig zu klären. Wie jedoch in nachfolgenden Kapiteln dargelegt wird, muß nicht unbedingt die abweichende Länge der Schwanzfaser die entscheidende Rolle spielen. Wahrscheinlicher erscheint es, daß die Sequenz dieser hybriden Schwanzfaser die strukturelle Information für eine korrekte Morphogenese des Moleküls verloren hat.

2.2 Linkerinsertionen und ihr Einfluß auf die Infektivität der Phagen

Nur ein geringer Teil der Fragestellungen, die Struktur und Funktion der Schwanzfasergene betreffen, lassen sich durch die Konstruktion von Hybridphagen beantworten. Solche Hybridbildungen erweisen sich vor allem in den Fällen als günstig, in denen bekannte funktionelle Eigenschaften wie z. B. die Rezeptorerkennung, durch die sich die einzelnen Phagen voneinander unterscheiden, innerhalb bestimmter Gene oder Genabschnitte lokalisiert werden sollen, oder aber die Austauschbarkeit einzelner Gene wie *U* und *tfs* nachgewiesen werden muß. Jedoch erlaubt diese Methode relativ wenig Aussagen über die Flexibilität der Schwanzfaser auf der Ebene ihrer Primärstruktur, d. h. welche Variationen der bestehenden Gensequenz noch erlaubt sind, um eine intakte Struktur und Funktion des Genprodukts zu gewährleisten. Unterschiede in der Primärstruktur der Schwanzfaserproteine von P1 und P7 zeigen sich besonders deutlich in der Deletion innerhalb des IR's von P7. Ein noch weitaus kürzeres Schwanzfasergen besitzt der Phage Mu, der mit P1 und P7 nur den Bereich des G-Segments gemeinsam hat. Die IRs dieses Phagen umfassen gerade 34bp gegenüber den 640bp langen IRs von P1, und auch der konstante Teil S_c der Schwanzfasergene *S* und *S'* ist in Mu nur ungefähr halb so lang wie 19_c in P1 (vgl. Abb. 1). Dies legte nahe, daß in der Schwanzfaser

Tabelle 13

Kreuzung von Linkerinsertionen und Deletionen in P1 und P7 *

Kreuzung Phage		Plasmid	Plaquebildende Rekombinanten	Isolierte Phagenmutante
P1/P7#2-13	x	pWR2-13/21	+	P1/P7#2-13/21
	x	pWR2-13/41	+	P1/P7#2-13/41
	x	pWR2-13/5	-	-
	x	pWR2	+	
P1*Cm*#6-2	x	pGP6-2/15	-	-
	x	pGP6-2/28	-	-
	x	pGP6	+	
P1*Cm*#6-5	x	pGP6-5/11	-	-
	x	pGP6	+	
P1/P7#1-15	x	pWR1-15/16	+	P1/P7#1-15/16
	x	pWR1	+	
P1/P7#2-6	x	pWR2-6/4	+	P1/P7#2-6/4
	x	pWR2	+	
P1*Cm*#5-2	x	pGP5-2/8	-	-
	x	pGP5	+	
P1*Cm*#5-80	x	pGP5-80/8	-	-
	x	pGP5	+	
P1*Cm*#5-11	x	pGP5-80/8	-	P1*Cm*#5-11/80-8
P1*Cm*#5-50	x	pGP5-50/6	-	-
	x	pGP5	+	
P1*Cm*#5-122	x	pGP5-122/1	-	-
	x	pGP5	+	
P1*Cm*#5-11	x	pGP5-122/1	-	P1*Cm*#5-11/122-1
P1/P7#2-22	x	pWR2-22/1	-	-
	x	pWR2	+	
P1*Cm*#5-9	x	pGP5-9/2	-	P1*Cm*#5-9/2
	x	pGP5	+	
P1*Cm*#5-11	x	pGP5-9/2	-	P1*Cm*#5-11/9-2
P1*Cm*#5-108	x	pGP5-108/12	+	P1*Cm*#5-108/12
	x	pGP5	+	
P1*Cm*cts100	x	pWR2-34	-	P1/P7#2-34
P1*Cm*cts100	x	pGP5-606	-	P1*Cm*#5-606
P1*Cm*cts100	x	pGP5-122/5	-	P1*Cm*#5-122/5
P1*Cm*cts100	x	pGP5-125/17	-	P1*Cm*#5-125/17

* Rekombinante Phagen wurden als Plaques von S1652 oder CSH50 isoliert. Die Kontrollexperimente mit pGP6, pGP5, pWR1 und pWR2 liefern Rekombinanten zum Wildtyp. Bei der Kreuzung zwischen P1/P7#2-13 und pWR2-13/5 wurde zwar Transduktion der Cm^r beobachtet, jedoch konnten keine Phagen mit der entsprechenden Linkerinsertion isoliert werden.

Bereiche existieren, die für ihre Funktion nicht von Bedeutung sind. Um näheren Aufschluß über die Struktur-Funktions-Beziehung der Schwanzfasern zu erhalten, wurden gezielt Linkerinsertionen und Deletionen in die Schwanzfasergene von P1 und P7 eingeführt und ihr Einfluß auf die Infektivität der Phagen getestet.
In Plasmiden mit Kn-Insertionen innerhalb des konstanten oder variablen Teils von Gen *19* oder in *tfs* wurde das Kn-Fragment deletiert. Abhängig von der Art des Restriktionsenzyms, mit dem die Deletion durchgeführt wurde, ergaben sich Linkerinsertionen von unterschiedlicher Sequenz und Länge (Abb. 18; vgl. Material und Methoden, 4.2.1). Solche Linkerplasmide wurden gegen den entsprechenden defekten Kn^r Phagen gekreuzt, wobei ein Wildtyp-Plasmid mit dem ursprünglichen, nicht mutagenisierten Fragment als Kontrolle diente (Tab. 13). Wurde die Infektivität des Phagen durch die Rückkreuzung mit dem Linkerplasmid wieder hergestellt, so konnten rekombinante Phagen als Cm^r Kn^s Phagenpartikel aus den infizierten Zellen isoliert werden. Erhielt man bei einer solchen Kreuzung keine Infektion, so war dies ein Hinweis darauf, daß mit der Insertion eine strukturell oder funktionell bedeutsame Region der Schwanzfaser getroffen worden war. In diesem Fall mußten die rekombinanten Phagen zum Nachweis der Insertion auf anderem Wege erzeugt werden, wobei die Fähigkeit der P1 Phagen zur Mobilisierung der Linkerplasmide und damit zur Transduktion der Ap^r ausgenutzt wurde (s. Material und Methoden, 5.4). Die aus den Linkerinsertionen resultierenden Nukleotid- und Aminosäuresequenzen dieser Schwanzfasermutanten sind in Abb. 18 dargestellt.

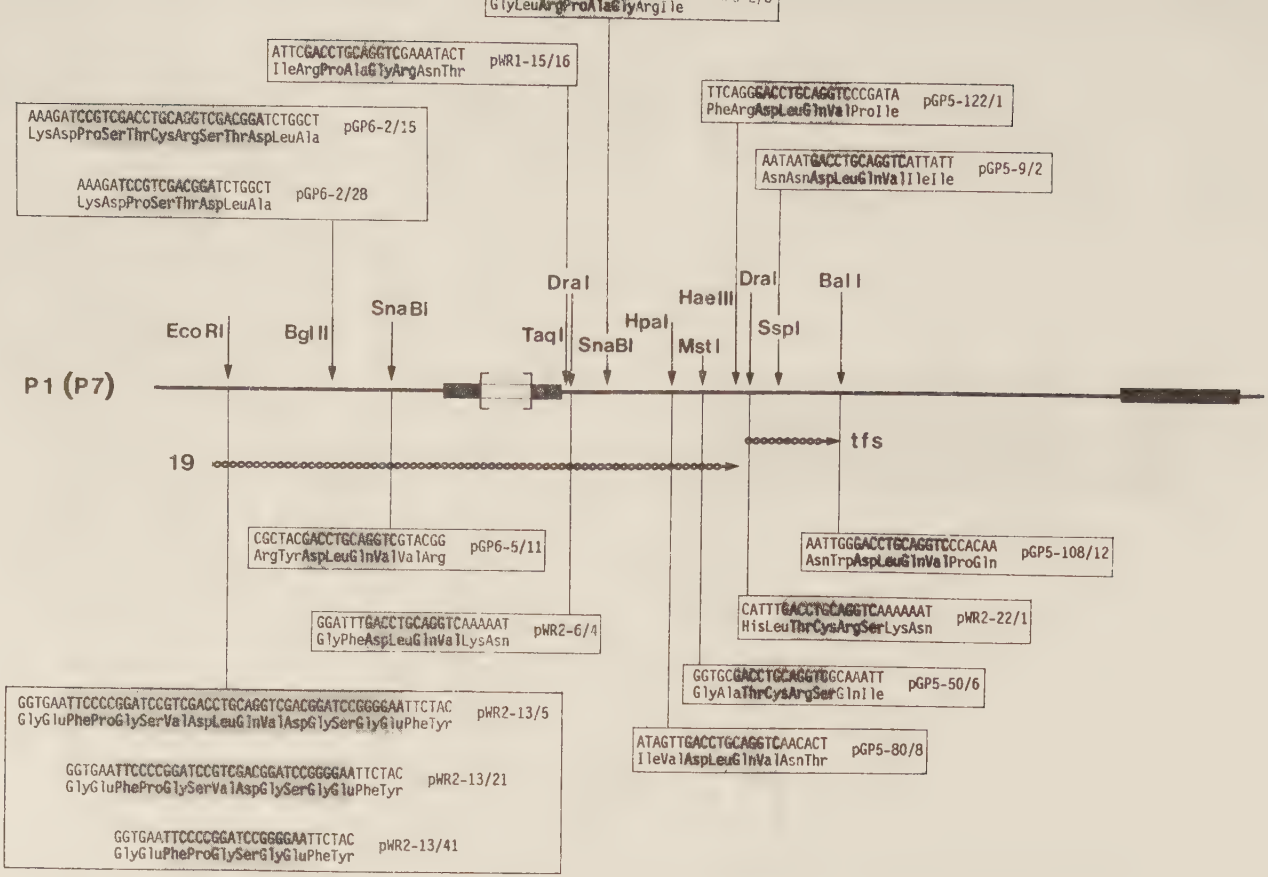
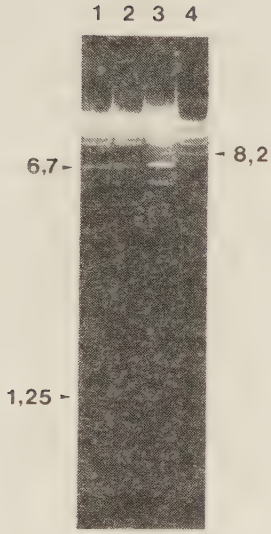


Abb. 18. Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Linkerinsertionen (schattiert) in den Schwanzfasergenen 19 und tfs der Phagen P1 und P7 zusammen mit einem kurzen Bereich der flankierenden Sequenz.

2.2.1 Der NH_2-Terminus im konstanten Teil von Gen *19* ist flexibel

Während die Kn-Insertion in der EcoRI-Schnittstelle in P7 zu defekten Phagen führt (P1/P7#2-13; Abb. 9), stellen die mit BamHI und SalI daraus abgeleiteten Linkerinsertionen mit 6 bzw. 10 zusätzlichen Aminosäuren die Infektivität der Phagen wieder her (P1/P7#2-13/41 bzw. P1/P7#2-13/21). Beide Phagen plattieren auf ihren natürlichen Wirtsstämmen mit gleicher Effizienz wie P1 Wildtyp-Phagen. Eine Restriktionsanalyse der mutierten Phagen mit BamHI weist die Linkerinsertionen in den Phagen nach (Abb. 19). Deletiert man hingegen die Kn-Resistenz mit PstI und kreuzt anschließend dieses Plasmid, das nun eine Insertion von 14 Aminosäuren trägt, gegen P1/P7#2-13, so erhält man zwar Transduktion von Cm^r aus unbekannten Gründen gelang es jedoch nicht, Phagenpartikel mit dieser Linkerinsertion zu isolieren.
Die Flexibilität des NH_2-Terminus von Gen *19* ist insofern erstaunlich, als diese Domäne vermutlich mit dem Phagenschwanz in Wechselwirkung tritt. Es ist daher nicht zu erwarten, daß die Struktur des NH_2-Terminus unbegrenzt variabel ist. Mit Ausnahme der Insertion von 14 Aminosäuren dürfte somit in allen Mutanten die benötigte Struktur erhalten bleiben, während die veränderte Länge der Schwanzfaser anscheinend keine Rolle spielt. Auf die mögliche Struktur dieser Linkermutanten wird in der Diskussion ausführlich eingegangen.
Die Kn-Insertionen in P1*Cm*#6-2 und P1*Cm*#6-5 befinden sich in der Mitte des konstanten Teils des Schwanzfasergens bzw. kurz vor dem IR. Die Kn-Insertion im BglII-Schnitt von 19_c wurde mit PstI und SalI deletiert, was zu einem Linker für vier bzw. acht zusätzliche Aminosäuren führt (pGP6-2/15 bzw. pGP6-2/28). Ein 12bp Linker bleibt in der SnaBI-Stelle von pGP6-5/11 zurück (Abb. 18). Bei der Kreuzung von P1*Cm*#6-2 und P1*Cm*#6-5 gegen die entsprechenden Linkerplasmide erhält



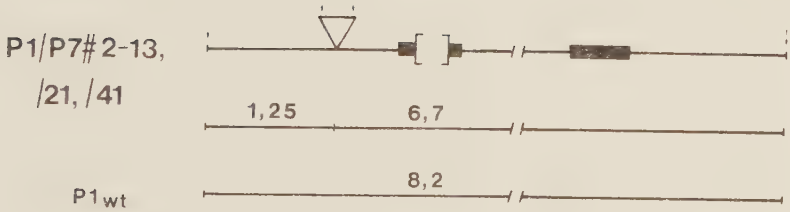


Abb. 19. Restriktionsanalyse von P1/P7#2-13, P1/P7#2-13/21 und P1/P7#2-13/41 durch BamHI (1,4% Agarose, 60mA, 4hs). 1: P1/P7#2-13/21; 2: P1/P7#2-13/41; 3: P1/P7#2-13; 4: P1Cmcts100. Dargestellt ist das BamHI-6 Fragment von P7 (entsprechend BamHI-5 von P1; Iida und Arber, 1979). Die Kn- bzw. Linkerinsertionen in der EcoRI-Schnittstelle von BamHI-6 sind durch ein Dreieck, die BamHI-Schnitte durch Pfeile gekennzeichnet. In P1/P7#2-13 und P1/P7#2-13/21 wurden durch die Insertionen zwei zusätzliche BamHI-Schnittstellen in BamHI-6 eingeführt. P1/P7#2-13/41 enthält nur eine zusätzliche BamHI-Schnittstelle. In allen Mutanten verschwindet demnach das 8,2kbp Fragment von P1 und wird durch zwei Fragmente von 1,25kbp und 6,7kbp ersetzt. Die höhere Intensität der 1,25kbp-Bande in P1/P7#2-13 rührt von dem zusätzlich durch BamHI erzeugten 1,25kbp langen Kn-Fragment. Einige schwache Banden stammen von partiell verdauten Fragmenten.

man keine infektiösen Phagenpartikel, wobei die Länge der Linkerinsertionen in der BglII-Stelle hierbei offensichtlich keine Rolle spielt. Die Empfindlichkeit dieses Bereichs gegenüber Insertionen ist besonders im Hinblick auf die relative Flexibilität des NH_2-Terminus der Schwanzfaser erstaunlich. Vom Mittelteil der Schwanzfaser ist hauptsächlich eine strukturelle Funktion zu erwarten. Zusätzliche Aminosäuren in diesem Bereich stören offensichtlich den Aufbau des Schwanzfasermoleküls. Die Insertionen innerhalb des BglII-Schnitts befinden sich nahe eines kurzen Sequenzbereichs, der als einziger im konstanten Teil der Schwanzfaser eine signifikante Homologie zwischen P1 und Mu aufweist (Kamp et al., 1984; vgl. Abb. 27), und dies spricht dafür, daß diese Sequenz nicht beliebig variiert werden darf. Eine ähnliche Überlegung trifft auf die Insertion in P1*Cm*#6-5 zu, die sich innerhalb einer gut konservierten Sequenz-Duplikation der P1-Schwanzfaser befindet (vgl. Abb. 26).

2.2.2 Die Flexibilität des variablen Teils der Schwanzfaser ist abhängig vom Abstand zum COOH-Terminus

P1/P7#1-15 und P1/P7#2-6 sind Insertionsmutanten in der P7-Schwanzfaser, die unmittelbar hinter dem kurzen IR kartieren (Abb. 9). Die Kreuzung der Kn-Insertionen gegen die mit PstI erzeugten Linkerinsertionen pWR1-15/16 bzw. pWR2-6/4 führt zu den plaquebildenden Phagen P1/P7#1-15/16 bzw. P1/P7#2-6/4. In beiden Fällen führt die 12bp-Insertion zu vier zusätzlichen, wegen des verschobenen Leserasters jedoch unterschiedlichen Aminosäuren (Abb. 18). Der Beweis für die Insertion des Linkers in den Phagen wurde durch einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI geführt (Abb. 20).

Tabelle 14

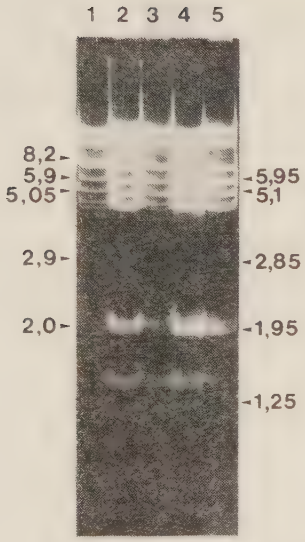
Inaktivierung von P1*Cmc*ts100 durch Mu*G(+)* Antiserum in Anwesenheit verschiedener Phagenmutanten *

	Phagenmutante	% überlebende Phagen
P1Cmcts100	-	28%
	P1Cm#5-80	26%
	P1Cm#5-11/80-8	22%
	P1Cm#5-11/122-1	29%
	P1Cm#5-11/9-2	25%
	P1Cm#5-14	24%
	P1Cm#5-60/6	25%
	P1/P7#2-34	50% **
	P1Cm#5-122/5	25%
	P1Cm#5-125/17	24%

* 0,1ml Lysat von P1*Cmc*ts100 (245 pfu; 100%) wurden mit 0,1ml Antiserum gegen MuG(+) (Verdünnung entsprechend einer Überlebensrate von 28% für P1*Cmc*ts100) und mit 0.1ml unverdünntem frischen Lysat der jeweiligen Phagenmutante inkubiert (37°C; 1h). Die Mischungen wurden nach Zugabe von 0,2ml Kultur S1652 weitere 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 2,5ml Na-Soft Agar ausplattiert und bei 42°C über Nacht inkubiert. Das Antiserum wurde von Frau R. Sandulache zur Verfügung gestellt (Sandulache, 1985).

** Die neutralisierende Wirkung der Lysate von P1/P7#2-34 gegenüber dem Antiserum variiert sehr stark. So wurden mit älteren Lysaten Überlebensraten für P1*Cmc*ts100 von bis zu 100% beobachtet.

In allen übrigen Insertionsmutanten des variablen Teils von Gen *19* - P1*Cm*#5-2, P1*Cm*#5-80, P1*Cm*#5-50 und P1*Cm*#5-122 - lassen sich durch Kreuzung mit den Linkerplasmiden (pGP5-2/8, pGP5-80/8, pGP5-50/6 bzw. pGP5-122/1) keine infektiösen Phagenpartikel erhalten. Da wie eingangs erwähnt in diesem Fall keine Selektionsmöglichkeit auf die Linkerinsertion möglich ist, wurde diese für pGP5-80/8 und pGP5-122/1 über einen Umweg in die Phagen eingeführt (s. Material und Methoden, 5.4). Als Ausgangsphage für die Kreuzung wurde P1*Cm*#5-11 gewählt, dessen Gen *19'* durch eine Kn-Insertion inaktiviert worden war (Abb. 9). Dadurch konnten bei allen weiteren Untersuchungen dieser Linkerinsertionen Nebeneffekte von *19'* ausgeschlossen werden. Die rekombinanten Phagen, P1*Cm*#5-11/80-8 bzw. P1*Cm*#5-11/122-1, die die vier gleichen zusätzliche Aminosäuren besitzen, transduzieren weder Cm^r noch Kn^r und sind folglich nicht mehr in der Lage, ihren Wirt zu infizieren. Auch eine Neutralisierung des Mu*G(+)* Antiserums wurde nicht beobachtet (Tab. 14). Der Nachweis der Linkerinsertionen im Phagengenom wurde durch einen Doppelverdau mit EcoRI und PstI geführt (Abb. 21).
Es ist auffallend, daß nur die Insertionen, die kurz hinter dem kurzen IR liegen und somit am weitesten vom COOH-Terminus entfernt sind, die Bildung infektiöser Phagen zulassen. Wie auch die natürliche Deletion im IR von P7 und der kurze IR von Mu zeigen, scheint diese Domäne in seinen strukturellen Anforderungen flexibler zu sein. Die vier dem COOH-Terminus am nächsten gelegenen Mutationen befinden sich entweder innerhalb oder in unmittelbarer Nachbarschaft zur LPS-Bindungsstelle. Diese Domäne erscheint daher nicht nur wichtig für die Rezeptorerkennung; da die Linkermutanten keinerlei neutralisierende Wirkung gegenüber dem Antiserum zeigen, ist zu vermuten, daß Insertionen in diesem Bereich auch den geordneten dreidimensionalen Aufbau der Schwanzfaser beeinflussen.



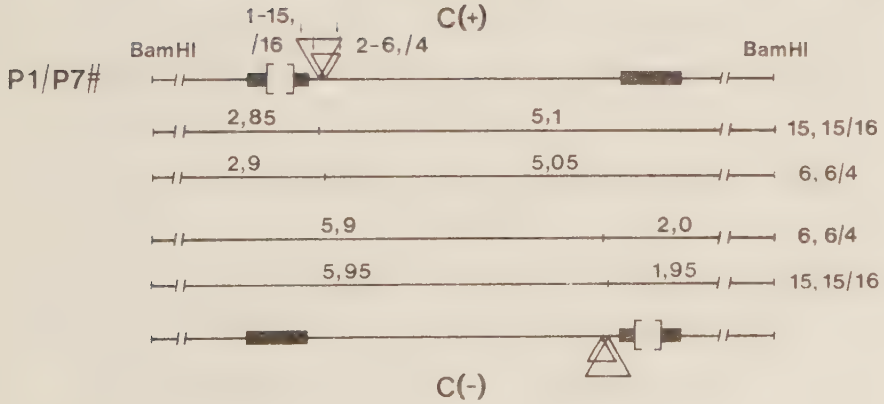


Abb. 20. Restriktionsanalyse von P1/P7#1-15, P1/P7#1-15/16, P1/P7#2-6 und P1/P7#2-6/4 durch Doppelverdau mit EcoRI und PstI (1,4% Agarose, 60mA, 4,5hs). 1: P1Cmcts100; 2: P1/P7#2-6; 3: P1/P7#2-6/4; 4: P1/P7#1-15; 5: P1/P7#1-15/16. Das BamHI-6 Fragment von P7 mit den Insertionen (▽) ist mit dem C-Segment entweder in C(+) oder C(-) Orientierung dargestellt. Pfeile kennzeichnen die PstI-Schnitte, die zur Kartierung der Mutanten herangezogen wurden. Nur die Kn-Insertionen enthalten zwei zusätzliche PstI-Schnitte, in den Linkerinsertionen existiert nur ein einziger Schnitt. BamHI-6 von P7 entspricht dem BamHI-5 Fragment von P1 (8,2kbp, Spur 1) und besitzt keine PstI-Schnitte. Es wird daher im Doppelverdau mit EcoRI und PstI nicht gespalten. Einige der charakteristischen Fragmente laufen fast identisch mit anderen Fragmenten gleicher Größe und sind daher nur schwer zu erkennen. Das 1,25kbp-Fragment erscheint erwartungsgemäß nur in den Mutanten mit dem Kn-Fragment. Einige schwache Banden oberhalb von 8,2kbp resultieren aus einer unvollständigen Spaltung der Fragmente.

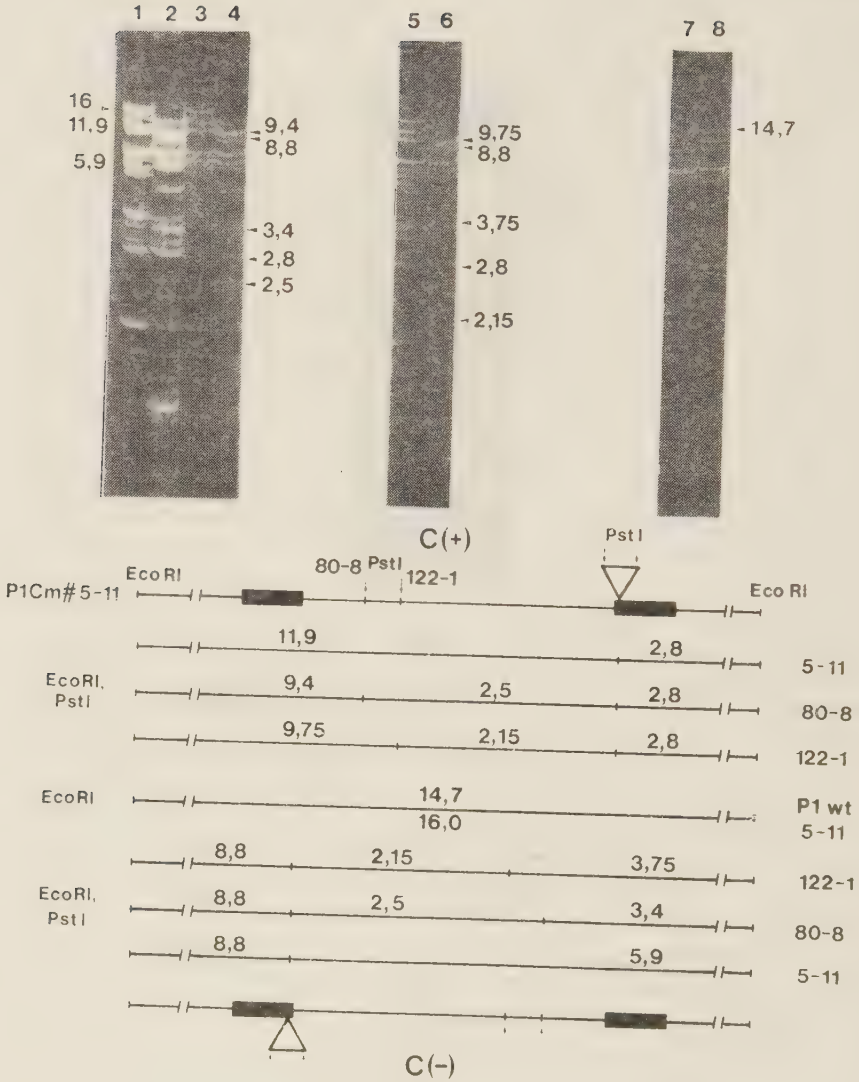
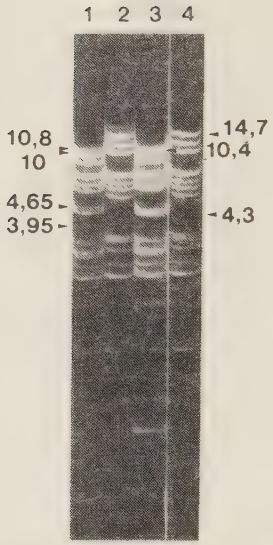


Abb. 21. Restriktionsanalyse der Linkermutanten P1Cm#5-11/80-8 und P1Cm#5-11/122-1 durch EcoRI und PstI (1,4% Agarose, 60mA 4,5hs). 1: P1Cm#5-11 + EcoRI; 2: P1Cm#5-11 + EcoRI,PstI; 3: P1Cm#5-11/80-8 + EcoRI; 4: P1Cm#5-11/80-8 + EcoRI,PstI; 5: P1Cm#5-11/122-1 + EcoRI; 6: P1Cm#5-11/122-1 + EcoRI,PstI; 7: P1Cmcts100 + EcoRI,PstI; 8: P1Cmcts100 + EcoRI. Dargestellt ist das EcoRI-1 Fragment aus P1 mit dem C-Segment in C(+) und C(-) Orientierung. Das Dreieck kennzeichnet die Kn-Insertion in P1Cm#5-11 und den davon abgeleiteten Derivaten. EcoRI-1 erhält durch die Kn- und Linkerinsertionen zusätliche PstI-Schnitte, die zur Kartierung der Mutanten herangezogen wurden. Als Größenmarker dienten die bekannten Restriktionsfragmente aus P1 (Bächi und Arber, 1977). Gezeigt sind nur die für die Kartierung der Insertionsmutanten wesentlichen Fragmente. Größenangaben in kbp.

2.2.3 Nur der COOH-Terminus von *tfs* ist flexibel

Drei Kn-Insertionen befinden sich innerhalb des *tfs* Gens, das sich an Gen *19* von P1 bzw. P7 anschließt. Alle Insertionen verhindern die Plaquebildung der Phagen. Die Kreuzung der Kn-Insertion im NH_2-Terminus des *tfs* Gens von P7 (P1/P7#2-22) gegen das entsprechende Linkerplasmid (pWR2-22/1; Abb 18) kann dieses Gen nicht restaurieren. Gleiches gilt auch für die Kreuzung von P1*Cm*#5-9, dessen Insertion nach dem ersten Drittel des *tfs* Gens von P1 kartiert, mit pGP5-9/2 (Abb. 18). In P1*Cm*#5-108 befindet sich die Kn-Insertion im COOH-Terminus und eine Kreuzung mit dem Linkerplasmid pGP5-108/12 führt zu plaquebildenden Phagenpartikeln auf S1652 und CSH50 (P1*Cm*#5-108/12; Abb. 18 und 22).
Obwohl die Rückkreuzung von P1*Cm*#5-9 gegen pGP5-9/2 keine plaquebildenden Phagenpartikel lieferte, konnte die Rekombinante P1*Cm*#5-9/2 mit der Linkerinsertion in *tfs* als $Cm^r Kn^s$ Transduktante auf CSH50 isoliert werden (Abb. 18 und 22). Dies kommt entweder dadurch zustande, daß die defekte Linkermutante durch die Schwanzfasern von P1"C(-)" Phagen, die Stämme wie CSH50 mit geringer Frequenz lysogenisieren, komplementiert wird, oder aber selbst noch eine schwache Adsorptionsfähigkeit aufweist. Um den Einfluß der Linkerinsertion von P1*Cm*#5-9/2 auf die Infektivität der Phagen ohne mögliche Effekte von Gen *19'* untersuchen zu können, wurde auch pGP5-9/2 in P1*Cm*#5-11 gekreuzt. Infiziert man CSH50 oder S1652 mit einem Lysat der auf diese Weise konstruierten Linkermutante P1*Cm*#5-11/9-2, so erhält man tatsächlich Cm^r und Kn^r Lysogene. Aus einer dieser Transduktanten wurde der Phage P1*Cm*#5-11/9-2h präpariert, der mit einer Effizienz von ca. 10^{-5} auf S1652 plattiert. Die Plaques sind jedoch deutlich feiner als die des Wildtyps und nur schwer als Einzelplaques zu erkennen. Es erscheint



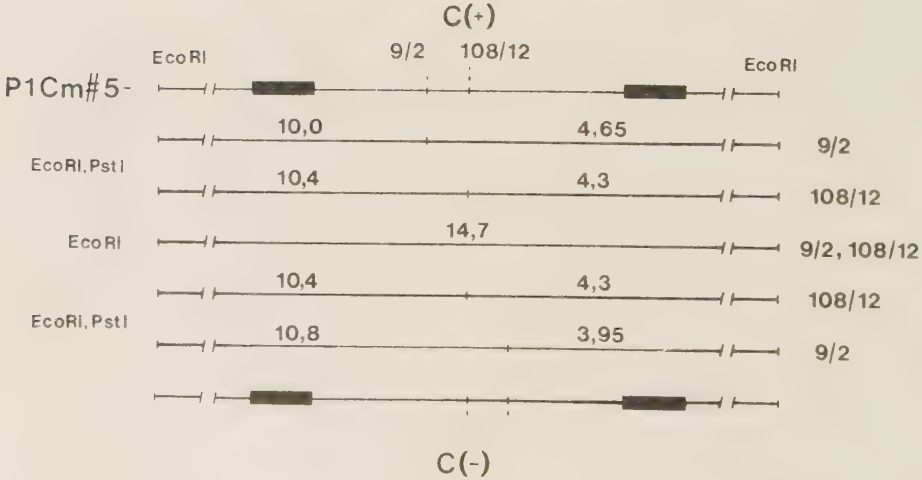


Abb. 22. Restriktionsanalyse von P1Cm#5-9/2 und P1Cm#5-108/12 mit EcoRI und PstI. (1,4% Agarose, 60mA, 4,5hs). 1: P1Cm#5-9/2 + EcoRI,PstI; 2: P1Cm#5-9/2 + EcoRI; 3: P1Cm#5-108/12 + EcoRI,PstI; 4: P1Cm#5-108/12 + EcoRI. Dargestellt ist das EcoRI-1 Fragment von P1 mit dem C-Segment entweder in C(+) oder C(-) Orientierung. Die zusätzlichen PstI-Schnitte in den Linkerinsertionen, durch die das Fragment gespalten werden kann und die zur Kartierung herangezogen wurden, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Größenangaben in kbp.

daher wahrscheinlich, daß das *tfs* Gen mit der Linkerinsertion noch eine gewisse Restaktivität besitzt und durch Sekundärmutationen stabilisiert werden kann, was dann zu plaquebildenden Phagen führt.
In allen beschriebenen Insertionen in *tfs* codiert der Linker für vier zusätzliche Aminosäuren, die für die Insertionen in der SspI- und der BalI-Stelle identisch sind (Abb. 18). Diese Linkermutanten bestärken frühere Vermutungen, daß der NH_2-Terminus für die Funktion des Gens eine entscheidendere Bedeutung als der COOH-Terminus hat. Die Beobachtung, daß die Linkerinsertion in P1*Cm*#5-108/12 im Gegensatz zu den Mutationen nahe dem NH_2-Terminus ohne jeden Einfluß auf die Infektivität der Phagen ist, spricht dafür, daß auch die Divergenz zwischen *U* und *U'* bzw. *tfs* und *tfs'* nicht ausschließlich auf ein Spezialisierung der Gene zurückzuführen ist, sondern daß sich hierin auch eine geringere strukturelle und funktionelle Bedeutung dieser Domäne wiederspiegeln kann.

2.3 Der Mittelteil des Schwanzfasergens *19* von P1 und P7 ist entbehrlich

Die Sequenzierung der P7-Schwanzfaser hatte gezeigt, daß eine Deletion von 279bp, wie sie in der Schwanzfaser von P7 auftritt, nicht notwendig den Verlust ihrer Funktion nach sich ziehen muß. Zusammen mit der Tatsache, daß der Phage Mu ein noch weitaus kürzeres Schwanzfasergen besitzt, wirft dies die Frage auf, ob Teile der P1-Schwanzfaser generell entbehrlich sind und ob ihre Länge möglicherweise sogar auf die Länge im Phagen Mu reduziert werden kann, ohne daß ihre Funktion gestört wird.
Wegen der natürlichen Deletion in P7 erschien es aussichtsreich, zur Beantwortung dieser Frage eine Deletion in diesem Bereich zu konstruieren. Die 606bp HindII-Deletion in pWR2-34, durch die der Leserahmen nicht verändert wird,

reicht vom konstanten Teil 19_c des Schwanzfasergens von P7 bis in den kurzen IR, so daß gleichzeitig eine Inversion unmöglich gemacht wird und nur das verkürzte Gen *19* exprimiert werden kann. Der Deletionsendpunkt im IR liegt nur kurz hinter dem Ende der natürlichen Deletion von P7, und die Länge des verbliebenen konstanten Teils des Schwanzfasergens entspricht ungefähr derjenigen des Phagen Mu. Die Gesamtlänge dieses verkürzten Gens beträgt annähernd 630 Aminosäuren gegenüber den 504 Aminosäuren des Schwanzfaserproteins S in Mu und den 928 Aminosäuren von 19 in P1. Diese Deletion wurde aus pWR2-34 in P1*Cmc*ts100 gekreuzt, wobei die zusätzlich in den Phagen gekreuzte Kn-Resistenz des Plasmids als Selektionsmarker diente. Die Phagenrekombinante P1/P7#2-34 (Abb. 9) zeigte sich zunächst als nichtinfektiös für S1652 oder CSH50. Wird ein Phagenlysat von P1/P7#2-34 jedoch nicht frisch sondern erst nach 16-24h auf einen Bakterienrasen getropft, so beobachtet man an der Stelle des Tropfens einen deutlichen Lysisbereich, aus dem sich Cm^rKn^r Lysogene isolieren lassen. Phagen, die aus solchen Lysogenen präpariert wurden, zeigten dasselbe Verhalten wie der Ausgangsphage P1/P7#2-34 und erwiesen sich auch im Restriktionsmuster als mit diesem identisch. Die Phagenlysate von P1/P7#2-34 zeigten außerdem eine deutliche Neutralisierung des Mu*G(+)* Antiserums (Tab. 14).

Eine zweite Deletionsmutante, P1*Cm*#5-606, hervorgegangen aus der Kreuzung zwischen pGP5-606 und P1*Cmc*ts100, trägt eine 399bp-Deletion innerhalb des C-Segments (Abb. 3 und 9). Die Kn-Insertion dieses Phagen, die wiederum als Selektionsmarker diente, bewirkt gleichzeitig eine Inaktivierung von Gen *19'*, so daß Nebeneffekte dieser Schwanzfaser ausgeschlossen werden können. P1*Cm*#5-606 erwies sich als nichtinfektiös und war auch nicht in der Lage, Mu*G(+)* Antiserum zu neutralisieren (Tab. 14). Dies entspricht den Erwartungen, da diese Deletion sehr weit in den COOH-Terminus des Schwanzfasergens reicht, der bereits durch die Analyse der Linkerinsertionen

in *19* als wesentlicher Bestandteile für den Aufbau einer intakten Schwanzfaser ausgemacht werden konnte.
Diese Ergebnisse bestätigen im wesentlichen die Hypothese, daß der mittlere Teil des Schwanzfasermoleküls von P1 für seine Funktion entbehrlich ist. Die Beobachtung, daß die Phagen eines Lysats von P1/P7#2-34 erst nach einiger Zeit zur Infektion in der Lage sind, spricht am ehesten für eine verlangsamte Morphogenese der Schwanzfaser. Denkbar wäre z. B. eine Oligomerisierungsreaktion, wobei die kooperative Faltung der Polypeptidketten durch die Deletion gestört sein könnte. Für die Infektivität der Phagen dürfte also weniger die Länge der Schwanzfasern eine Rolle spielen, als daß bestimmte Strukturelemente erhalten bleiben, die die korrekte Synthese des Moleküls gewährleisten. Hierdurch erklärt sich auch das Verhalten der Hybride von *19* und *19'* (2.1.3.3), deren fehlende Infektivität wohl auf einen Strukturabbruch im COOH-Terminus des Schwanzfasermoleküls zurückzuführen ist.

3. Die Inversionsfunktion *cin* des Phagen P7 im Vergleich mit P1

Ein größerer struktureller Unterschied in der Organisation der Inversionssysteme der Bakteriophagen Mu und P1 liegt in der unterschiedlichen Orientierung der Gene für die Inversionsfunktionen Gin bzw. Cin bezüglich des invertierbaren Segments. In Mu erfolgt Transkription fort vom invertierbaren Segment, in P1 verläuft die Transkriptionsrichtung entgegengesetzt (Plasterk und van de Putte, 1983; Hiestand-Nauer und Iida, 1983; Ritthaler, 1983). Elektronenmikroskopische Hetreoduplexuntersuchungen zwischen P1 und P7 zeigten in Nachbarschaft des invertierbaren C-Segments eine ausgedehnte Sequenzhomologie (Chow et al., 1979), so daß für das *cin* Gen in P7 die gleiche genomische Anordnung wie in P1 erwartet werden konnte. Auch geringere Unterschiede in der Primärstruktur der Inversionsfunktionen von P7 und P1, über die elektronenmikroskopische Heteroduplex-Untersuchungen wegen ihrer begrenzten Auflösungsfähigkeit keine Aufschlüsse zulassen, waren jedoch im Hinblick auf die Evolution der Phagen und ihrer Inversionssysteme von Interesse. Die Sequenzierung von P7 *cin* bestätigte die weitgehende Identität der beiden Gene. In P7 wie P1 erfolgt die Transkription in Richtung des invertierbaren Segments, und auch das translationale Stopcodon des P7 Gens liegt bereits innerhalb des IR's (Abb. 23). Eine SphI-Deletion, die in pWR2 den NH_2-Terminus dieses Gens entfernt, inaktiviert die Cin Funktion (s. a. Material und Methoden; Schmucker et al., 1986). Diese Deletion entfernt ebenso wie in P1 einen rekombinatorischen Enhancer, so daß auch die Inversion mittels einer in *trans* wirkenden Cin Funktion nur mit geringer Frequenz erfolgt (Schmucker et al., 1986). Der Sequenzvergleich der beiden Gene von P1 und

```
P7 5'-CTGCATAAGCGCCGCCCGGATCTAACAAAAATCAAGCAGGAACCTATTCGAGATTGTTATTTCTGTGCATAACG..CTTTGTTCTTTAAAATTCGCAGACTCATAAGAACAACG
      |   |  |   ||       |  |  ||| ||||    | |||    |  |  |||| |||||    ||||  |   ||||||  |||||||| |||||  |  ||  || ||||
P1 5'-CATAACTATTTCCTTAATAGTGAATTAAATATCATTGGGAAACGGTATGTACTTTGTGATTTCCACACATACTGGTTTTTGTTAATTAAAATCCGCAGCTTGCTATAAATAACG
      LeuHisLysArgArgProAspLeuThrLysIleLysGlnGluProIleArgAspCysTyrPheCysAla *
      HisAsnTyrPheLeuAsnSerGluLeuAsn   IleGlyLysArgTyrValLeu   Asp   HisThrTyrTrpPheLeuLeuIleLysIleArgSerLeuLeu *
                 ——— ORF ———                                                                  ———→

                 130                 150                 170                 190                 210                 230
CATTAGAGTAAAAATC  ATGCTGATCGGCTATGTACGCGTATCAACAAATGAACAAAACACTGCTTTGCAACGAAATGCCCTTGAAAGCGCAGGATGTGAGCTAATTTTTGAGGATAAG
     ||| | |||    ||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
ATAGTGAGCAGAAAAT  ATGCTAATAGGCTATGTACGCGTATCAACAAATGAACAAAACACTGCTTTACAACGAAACGCTCTTGAAAGCGCAGGATGTGAGCTAATTTTTGAGGACAAG
     SD           MetLeuIleGlyTyrValArgValSerThrAsnGluGlnAsnThrAlaLeuGlnArgAsnAlaLeuGluSerAlaGlyCysGluLeuIlePheGluAspLys
                  ⊢———————————— cin

                 250                 270                 290                 310                 330                 350
GCGAGCGGCAAACAGACTGAACGCCCTGGGCTAAAAAAGGTTTTGCGTATGCTTTCCAGAGGTGACACCCTGGTCGTATGGAAGTTAGATCGTCTTGGGCGCAGCATGCGTCACTTGGTT
||||||||||||| || |||| ||||||||| ||||||||||  | ||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||| |||
GCGAGCGGCAAAAAGGCTGAGCGCCCTGGGTTAAAAAAGGTACTCCGTATGCTTTCCAGAGGTGATACCCTAGTCGTATGGAAGTTAGACCGTCTTGGGCGCAGCATGCGTCACTTAGTT
AlaSerGlyLysGlnThrGluArgProGlyLeuLysLysValLeuArgMetLeuSerArgGlyAspThrLeuValValTrpLysLeuAspArgLeuGlyArgSerMetArgHisLeuVal
            LysAla

                 370                 390                 410                 430                 450                 470
GTGCTGGTGGAAGAGCTGCGTGACAGAGGAATTAATTTCCGGAGTCTCACTGACTCTATCGACACCAGTACACCAATGGGGCGCTTTTTCTTTCACGTAATGGGGGCGCTGGCAGAAATG
|||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GTGCTGGTGGAAGAGCTGCGTGACAGAGGCATTAACTTCCGGAGTCTCACTGACTCCATCGACACCAGTACACCAATGGGGCGCTTTTTCTTTCACGTAATGGGGGCGCTGGCAGAAATG
ValLeuValGluGluLeuArgAspArgGlyIleAsnPheArgSerLeuThrAspSerIleAspThrSerThrProMetGlyArgPhePhePheHisValMetGlyAlaLeuAlaGluMet

                 490                 510                 530                 550                 570                 590
GAACGTGAGCTTATCGTTGAACGTACACGCGCTGGACTTGATGCAGCTCGCGACGAAGGTCGTATAGGTGGGCGTCGGCCTAAATACCAAGAAGAAACATGGCAGCAAATGCGGCGATTG
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GAACGTGAGCTTATCGTTGAACGTACACGCGCTGGACTTGATGCAGCTCGCGCAGAAGGTCGTATAGGTGGGCGTCGGCCTAAATACCAAGAAGAAACATGGCAGCAAATGCGGCGATTG
GluArgGluLeuIleValGluArgThrArgAlaGlyLeuAspAlaAlaArgAspGluGlyArgIleGlyGlyArgArgProLysTyrGlnGluGluThrTrpGlnGlnMetArgArgLeu
                                                    Ala

                 610                 630                 650                 670                 690
                                                                                IR
CTGGAGAATGGCATCCCCCGTAAGCAGGTTGCAATCATCTATGATGTGGCTGTTTCCACGCTTTATAAGAAGTTTCCGGCGTCGTCATTTCAATCCTAAACCTTGGTTTAA
|||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CTGGAGAAGGGCATCCCCCGTAAGCAGGTTGCAATCATCTATGATGTGGCTGTTTCCACGCTTTATAAGAAGTTTCCGGCGTCATCATTTCAATCCTAAACCTTGGTTTAA
LeuGluAsnGlyIleProArgLysGlnValAlaIleIleTyrAspValAlaValSerThrLeuTyrLysLysPheProAlaSerSerPheGlnSer *          *
      Lys                                                                  ------————————→ cin
```

Abb. 23. Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Inversionsfunktion cin von P7 und ihrer "upstream" Region im Vergleich mit P1. Nur die unterschiedlichen Aminosäuren in P1 sind gezeigt. Die potentielle Pribnow-Box und die Shine Dalgarno Sequenz (SD) sind gekennzeichnet.

P7 zeigt eine Homologie von 96% auf DNA- sowie von 98,5% auf Proteinebene. Die Mehrzahl aller Nukleotidaustausche ist neutral, auffallend ist jedoch, daß alle drei ausgetauschten Aminosäuren jeweils durch wenig verwandte Aminosäuren ersetzt wurden (Abb. 23). Diese Austausche befinden sich aber ohne Ausnahme in Bereichen, die sich auch bei einem Vergleich zwischen den Invertase-Genen *cin*(P1), *gin, hin,* und *pin* als nur schlecht konserviert erwiesen (Plasterk und van de Putte, 1984). Dies macht verständlich, warum diese Aminosäure-Austausche auch auf die Funktion des P7 *cin* Gens keinen Einfluß nehmen.

Größere Unterschiede zwischen P1 und P7 finden sich in der Region stromaufwärts des *cin* Gens. Von den zwei möglichen Pribnow-Boxen, die für P1 vorgeschlagen wurden (Hiestand-Nauer und Iida, 1983), findet sich nur die mit einer idealen Pribnow-Box TATAAT gut übereinstimmende Sequenz TAAAAT konserviert in P7 wieder, die daher einen wahrscheinlicheren Promotor in beiden Systemen darstellt (Abb. 23) Die zugehörige -35 Region stimmt in beiden Phagen nur sehr unvollkommen mit der Consensus-Sequenz TTGACA überein, doch spricht dies nicht unbedingt gegen ein Transkriptionssignal, da die Expression des *cin* Gens nur sehr schwach ist (Huber et al., 1985) und folglich keine starken Promotorsequenzen benötigt würden. Eine potentielle Shine-Dalgarno Sequenz ist in beiden Phagen identisch (Abb. 23). Es ist jedoch auch denkbar, daß das *cin* Gen keinen eigenen Promotor besitzt und stattdessen in einem Operon transkribiert wird.

Sowohl in P1 als auch in P7 finden sich offene Leserahmen (ORF; Abb 23), die erst kurz vor dem *cin* Gen enden. Der Phage Mu trägt benachbart zu *gin* die Modifikationsfunktion *mom*, und eine entsprechende Funktion wäre auch für den Phagen P1 denkbar, wenn man annimmt, daß die Analogie der Inversionssysteme sich nicht nur auf die Schwanzfaser, das invertierbare Segment und die Inversionsfunktion erstreckt. Denkbar ist aber auch eine regulatorische Funktion, die auf indirekte Weise die Inversion und damit die Kontrolle des

Wirtsbereichs beeinflußt. Die Sequenzdaten sind jedoch nicht ausreichend, um hiervon auf die tatsächliche Existenz solcher Gene schließen zu dürfen (Abb. 23). Auffallend in der Region stromaufwärts des *cin* Gens ist in beiden Phagen auch eine deutliche palindromähnliche Sequenz (Abb. 24). In P7 wurde diese Sequenz durch das Computer-Programm "Stemloop" als beste selbstkomplementäre Region innerhalb der in Abb. 23 dargestellten Sequenz identifiziert, woraus sich die Signifikanz für das deutlich schwächer ausgeprägte Palindrom in P1 ergibt.

```
                                                          Anzahl der
                                                          Wasserstoffbrücken

        70
         .                   AAA
                            TA   TT
     5'-TAACGCTTTGTTCTT           C G
P7      ||| || ||||||||           C
     3'-ATTACGCAACAAGAA           A
                            TA   AG
                              CTC

        77
         .                   TCC
                            A   G
     5'-TTTTGTTAATTAAA           C
P1      | | |||| ||| |           A
     3'-ATAGCAATAAATAT           G
                            C   C
                              GTT
```

Abb. 24. "Stemloop"-Strukturen in der 5' "Upstream" Region des cin Gens der Bakteriophagen P7 und P1.

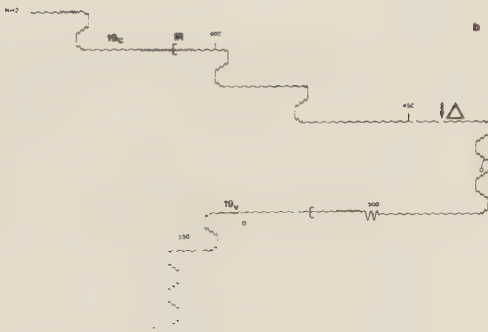
Sequenzen mit einer derartigen Symmetrie haben häufig eine regulatorische Funktion, und in diesem Fall ist beispielsweise ein Transkriptionssignal für ein dem *cin* Gen vorgelagertes Gen denkbar. Wird das *cin* Gen hingegen in einem Operon transkribiert, so könnte seine Expression durch eine Loop-Struktur der mRNA, die möglicherweise eine Ribosomen-Bindung erschwert, in der Art einer translationalen Attenuation reguliert werden. Umgekehrt erinnert diese Sequenz in ihrer Symmetrie auch stark an die Bindungsstellen von Repressormolekülen, die eine transkriptionelle Kontrolle der Genexpression bewirken. Da mögliche Promotor-Sequenzen für das *gin* Gen des Phagen Mu in dessen IRs lokalisiert wurden, die gleichzeitig die Bindungsstellen der Gin Funktion darstellen, wurde vermutet, daß die Gin Funktion über diese Bindung gleichzeitig die Transkription ihres Gens inhibiert und somit autoregulatorisch wirkt. Durch die unterschiedliche Orientierung des *cin* Gens in P1 und P7 ist hier eine Autoregulation nach diesem Muster nicht möglich. Hiestand-Nauer und Iida (1983) beschreiben jedoch eine die Promotorregion von P1 überlappende kurze Nukleotidsequenz, die dem Anfang der IRs ähnelt und als Bindungsstelle für Cin eine Autoregulation bewirken könnte. Auch die hier beschriebenen palindromartigen, an Operatoren erinnernden Sequenzen spielen möglicherweise für die Regulation der *cin* Expression eine Rolle, wobei die invertierten Sequenzwiederholungen innerhalb dieser symmetrischen Region als zwei Bindungsstellen für ein bislang unbekanntes regulatorisches Protein dienen könnten. Es bleibt daher weiter zu klären, in wie weit auch die Expression der Inversionsfunktionen von Mu, P1 und P7 eine Kontrolle über den Wirtsbereich dieser Phagen ausübt, der zunächst nur über die Inversion eines DNA-Segments reguliert zu werden scheint.

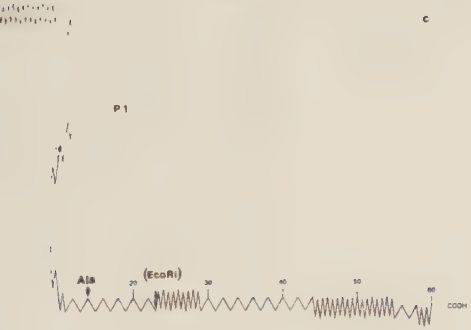
E Diskussion

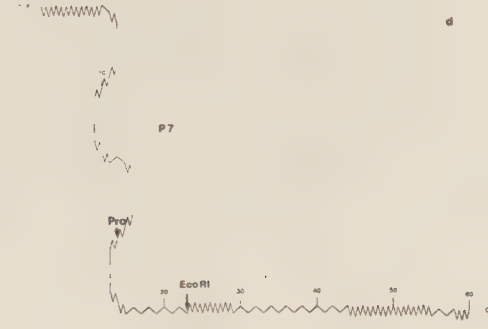
Die Bakteriophagen P1, P7 und Mu besitzen als gemeinsames Charakteristikum homologe invertierbare Elemente mit einer benachbarten Rekombinationsfunktion, die diese Inversion katalysiert. In allen drei Phagen bewirken diese invertierbaren Segmente die alternierende Expression von Genen, die für den Aufbau der Adsorptionsorganellen der Phagen, der Schwanzfasern, und somit ihrer Infektivität von wesentlicher Bedeutung sind. Sowohl P1 wie Mu besitzen einen breiten, sehr ähnlichen Wirtsbereich. Hierbei erscheint der Wirtsbereich von P1 noch etwas ausgedehnter, wie sich z. B. darin zeigt, daß nicht alle *E. Coli* Stämme, die als resistent gegen Mu isoliert wurden, auch resistent gegen P1 sind (Toussaint et al., 1978; Sandulache et al., 1984). Diese Variationsbreite der Rezeptorerkennung ist jedoch nicht allein auf die zwei verschiedenen Orientierungen des invertierbaren Segments zurückzuführen, vielmehr weist jede Schwanzfaser für sich eine außerordentliche Flexibilität der Rezeptorbindungsstellen auf, die nicht nur in der spontanen Bildung von Hostrange-Mutanten zum Ausdruck kommt, sondern auch in der Leichtigkeit, mit der die Wirtsbereiche der Phagen P1, P7 und Mu untereinander ausgetauscht werden können. Da auch ein Einfluß von Mg^{2+} und Ca^{2+} Ionen auf die Adsorptionsfähigkeit der Phagen nachgewiesen wurde, besteht zusätzlich die Möglichkeit ioneninduzierter Strukturveränderungen. In allen Fällen werden allerdings nur bereits vorhandene schwache Rezeptoraffinitäten verstärkt, jedoch keine grundsätzlich neuen Rezeptoren zugänglich gemacht. Auch die Rezeptorbindungsstelle von P1, die nur eine 50%ige Homologie mit Mu aufweist (vgl. Abb. 27), stellt letztlich eine Optimierung der Rezeptoraffinitäten von Mu dar.
Die Analyse der Schwanzfasern von P1 und P7 durch Insertionsmutagenese in Gen *19* zeigt, daß die Schwanzfaser Bereiche verschiedener Empfindlichkeit gegenüber

Veränderungen in der Aminosäuresequenz aufweist. Eine Chou-Fasman Analyse, die für die Schwanzfaserproteine von P1 und P7 durchgeführt wurde, bietet nur in wenigen Fällen eine Interpretationshilfe für das Verhalten der Mutanten. So befinden sich die Linker in P1/P7#2-13/41 und P1/P7#13/21 sämtlich in unmittelbarer Nähe einer β-Turn-Struktur und führen diese Struktur fort (Abb. 25e,f). Dasselbe gilt interessanterweise auch für den ersten Aminosäure-Austausch zwischen der Schwanzfaser von P1 und P7 (Ala - Pro, Position 1227 der P1 Sequenz; vgl. Abb. 5b), durch den in P7 zusätzliche β-Turn-Strukturen eingeführt werden (Abb. 25c,d). In der langen Linkerinsertion in pWR2-13/5 ist die β-Turn-Struktur dagegen durch eine kurze β-Faltblatt-Struktur unterbrochen (Abb. 25g), und dies mag ein Grund dafür sein, daß mit dieser Insertion nur eine schwache Infektivität beobachtet werden konnte. In den meisten Fällen ist eine solche einfache Interpretation aufgrund der Chou-Fasman Analyse jedoch nicht möglich, und es müssen kompliziertere strukturelle Gegebenheiten im Schwanzfaseraufbau angenommen werden, die nur durch elektronenmikroskopische oder röntgenanalytische Methoden aufgeklärt werden können.

Eine genaue Analyse der Schwanzfasern von P1 und P7 zeigte sowohl auf DNA- wie Aminosäure-Ebene in zwei Bereichen eindeutig die Existenz duplizierter Sequenzen. Eine ca. 150 Aminosäuren lange Sequenz vor dem IR besteht aus zwei nahezu identischen Einheiten von je 75 Aminosäuren (Abb. 26a, 27), wobei hier besonders die hohe Anzahl der in regelmäßigem Muster wiederkehrenden Prolinreste auffällt. Eine zweite Region signifikanter interner Homologie findet sich innerhalb der IRs (Abb. 26b, 27). Die defekten Mutanten vor dem IR (P1*Cm*#6-2 und P1*Cm*#6-5), die durch Linker nicht restauriert werden können, befinden sich unmittelbar vor oder sogar innerhalb der ersten Duplikation, und dies könnte dafür sprechen, daß sich hinter diesen Sequenzfolgen hoher Homologie, die durch die Insertionen unterbrochen werden,







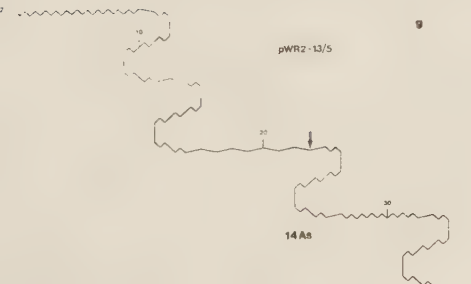


Abb. 25. Chou-Fasman Analyse von NH_2-Terminus und IR-Region ([ ]) in den Schwanzfasern von P1 und P7 (Chou und Fasman, 1978; Nishikawa, 1983). β-turn Strukturen sind durch 180° Windungen, β-Faltblatt und Coil Strukturen durch enge bzw. weite Sägezahn-Muster wiedergegeben. a,b: IR Region von P1 (a) und P7 (b); die Region zwischen den Pfeilen kennzeichnet in a den Bereich der Deletion Δ, die zum verkürzten IR in P7 (b) führt. c,d: Struktur des NH_2-Terminus von P1 bzw. P7 in Abhängigkeit von dem Aminosäure-Austausch Ala-Pro (vgl. Abb. 5b). Die Position des EcoRI-Schnitts in P7 und die entsprechende Position in P1 dienen als Orientierungshilfe. e-g: Potentielle Strukturen der Linkerinsertionen im NH_2-Terminus von Gen 19. Der Bereich zwischen den Pfeilen (EcoRI) zeigt die Länge der Insertionen in Aminosäuren (As, vgl. Abb. 18).

tatsächlich Strukturen verbergen, deren Konservierung für den strukturellen Aufbau der Schwanzfaser von Bedeutung sind. Andererseits erscheint gerade dieser Bereich entbehrlich, wie sich aus der Deletionsmutante P1/P7#2-34 ergibt, deren Schwanzfaser durchaus noch eine Aktivität aufweist. Da durch diese Deletion ganz offensichtlich die Morphogenese der Phagenpartikel verzögert wird, kann man vermuten, daß diese Domäne zwar die Funktion der Schwanzfaser nicht beeinflußt, daß der Erhalt ihrer Struktur jedoch den dreidimensionalen Aufbau der Schwanzfaser - vermutlich durch kooperative Faltung der einzelnen Schwanzfasermonomeren - erleichtert. Da die Linkerinsertionen von P1*Cm*#6-2 und P1*Cm*#6-5 nicht isoliert wurden, sondern ihr Defekt nur anhand der fehlenden Plaquebildung festgestellt wurde, ist es möglich, daß auch diese Insertionen ähnlich der Deletion in P1/P7#2-34 nur einen verlangsamenden Effekt auf die Morphogenese der Schwanzfaser ausüben. Tatsächlich ist die Deletionsmutante P1/P7#2-34 aber ein erster greifbarer Hinweis darauf, daß die Schwanzfasern in P1, P7 und Mu ähnlich wie in den Phagen T2, T3 oder T4 (Beckendorf, 1973; Kato et al., 1985; Ward and Dickson, 1971) als Multimere vorliegen.

In den vier dem COOH-Terminus am nächsten gelegenen Mutationen (P1*Cm*#5-2, P1*Cm*#5-80, P1*Cm*#5-50 und P1*Cm*#5-122) führen die Linkerinsertionen sämtlich zu defekten Phagenpartikeln, wobei sich die beiden erstgenannten Mutanten außerhalb der LPS-Bindungsstelle befinden, die innerhalb der letzten 100 Aminosäuren der Schwanzfaser kartiert wurde. Es ist bekannt, daß das distale Ende der Schwanzfaser des Phagen T4 über einen längeren Bereich vor der Rezeptorbindungsstelle eine hohe Periodizität aufweist (Earnshaw et al., 1979). Ähnliches läßt sich zwar für P1 allein anhand der Sequenzdaten nicht belegen, gerade unter der Annahme eines multimeren Moleküls ist es jedoch durchaus wahrscheinlich, daß auch dessen Schwanzfaser in ähnlicher Weise aufgebaut ist, so daß Linkerinsertionen diese

a

19c

```
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
pGP6-2/15/28
1701 5'- AGCGACAGCGAAACAATGGCGGCTACCCCTAAAGCTGTTAAGTCTATAAAAGATCTGGCTGATACC

67 -AAAGCGCCAATAGAAAGCCCGAGTCTGACAGGAACGCCAAGCGCGCCGACGGCAGCACGAGGTACAAACAGCACGCAGATAGCAAATACAGCCTTTGTTAAGGCAGCTATAACTGCACTT
95 ------ CCTTTAGCAAGTCCTGCATTAACAGGAATACCTACTGCGCCTACCGCTGCACAGGGTACGAATAACACGCAGATTGCTACGACCGCTTATGTAAGAGCTGCCATATCCGCACTG
LysAlaProIleGluSerProSerLeuThrGlyThrProSerAlaProThrAlaAlaArgGlyThrAsnSerThrGlnIleAlaAsnThrAlaPheValLysAlaAlaIleThrAlaLeu
LeuAla Ala Ile Thr Gln Asn Thr Tyr Arg Ser
pGP6-5/11

ATCAACGGTGCACCTGGCACACTGGATACACTTAAAGAAATAGCTGCTGCGATCAATAACGACCCGAATTTCAGCACAACTGTCAACAATGCTCTGGCCCTTAAAGCG ----- 1994
GTCGGCTCATCACCTGAAGCTCTTGATACCCTGAATGAGCTTGCAGCAGCACTGGGCAATGACCCGAACTTTGCGACAACAATGACAAATGCGCTGGCAGGGAAACAGCCACTT 2219
IleAsnGlyAlaProGlyThrLeuAspThrLeuLysGluIleAlaAlaAlaIleAsnAsnAspProAsnPheSerThrThrValAsnAsnAlaLeuAlaLeuLysAla
ValGlySerSer GluAla Asn Leu LeuGly Ala MetThr Gly GlnProLeu
```

b

```
IR-L

2481 2558
5'- ATCACCGGGGCACTGACAGGGAACGCCGACACCGCGACGAAATTGAAAACAGCACGCACTATTGGCGGTGTGGCATTTGATGGTACTGCGAATATT -3'
2880 5'- GGTAACGCGGCTACAGCGACCAAGTTGCAGACAGCATGTACTATCAACGGCGTCTCGTTTGATGGTTCTAAAAATATTGAGCTAACGGCGGAA--
GlyAsnAlaAspThrAlaThrLysLeuLysThrAlaArgThrIleGlyGlyValAlaPheAspGlyThrAlaAsnIle
Ala Gln Cys Asn Ser SerLys

3072 pWR1-15/16 pWR2-22/1 3125
--GATTTAAAT---/ /-----CTTGCTAGGATTCGAAATACTGACTGGGCAAAGATTGGATTTAAAAATGATGCC -3'
```

b. 26. Sequenzwiederholungen innerhalb des konstanten Teils 19c (a) und des IR's (b) des Schwanzfasergens 19 von P7. Die sitionen wichtiger Insertionsmutanten von P1 und P7 (vgl. Abb. 5b, 18) wurden gekennzeichnet.

Periodizität zerstören. Die Insertionsmutanten P1*Cm*#5-50 und P1*Cm*#5-122 liegen in oder zumindest sehr nahe der LPS-Bindungsstelle. Obwohl diese Region, wie durch die Hostrange-Mutanten zum Ausdruck kommt, leicht mutierbar ist, löst die Insertion von vier zusätzlichen Aminosäuren in diesen Mutanten offensichtlich einen gravierenden Defekt aus. Mit der isolierten Linkermutante P1*Cm*#5-11/122-1 wurde weder eine schwache Infektivität noch eine Neutralisierung von Antiserum beobachtet, und gleiches gilt für P1*Cm*#5-11/80-8. Es ist daher in beiden Fällen zu vermuten, daß diese Insertionen in den Phagen strukturelle Voraussetzungen für den dreidimensionalen Aufbau der Schwanzfaser zerstören. Nimmt man den Bakteriophagen T4, in dem die Dimerisierungsreaktion der Schwanzfaser am COOH-Terminus initiiert wird, als Beispiel, so ist es nicht verwunderlich, daß gerade der COOH-Terminus der P1 Schwanzfaser besonders empfindlich gegenüber solchen Insertionen reagiert.

Als einzige Deletionsmutante mit einer voll funktionsfähigen Schwanzfaser erweist sich im Vergleich mit P1 nur P7 selbst mit seinem verkürzten IR. Hierbei erscheint es interessant, daß diese Deletion genau zwischen den beiden homologen konservierten Sequenzen am Anfang und Ende des IR's liegt, so daß auch hier möglicherweise für die korrekte Faltung bedeutsame Sequenzen erhalten bleiben. Der deletierte Bereich scheint, wie wiederum eine Chou-Fasman Analyse nahelegt, besonders reich an β-turn Strukturen zu sein, und möglicherweise macht ihn diese Eigenschaft für die Funktion der Schwanzfaser besonders leicht entbehrlich (Abb. 25a,b).

Ob eine Linkerinsertion einen Defekt der Schwanzfaser zur Folge hat, scheint somit i. a. mehr vom Ort der Insertion als von der Art der eingefügten Aminosäuren abzuhängen. So ermöglichen die Insertionen in P1/P7#1-15/16 und P1/P7#2-6/4 die Bildung infektiöser Phagenpartikel, während dieselben vier Aminosäuren in P1*Cm*#5-11/80-8 zum Verlust der Infektivität führen. Dasselbe gilt bis zu einem gewissen Grade auch für eine Verlängerung oder eine Verkürzung der

Schwanzfaser, wie durch P7 selbst und die schwach infektiöse künstliche Mutante P1/P7#2-34 einerseits, sowie die nichtinfektiösen Mutanten P1*Cm*#5-122/5 oder P1*Cm*#5-125/17 andererseits gezeigt wird. Auch die Serum-Blocking Tests mit den zwei letztgenannten Mutanten zeigten keine Neutralisierung des Antiserums. Diese Mutanten reihen sich demnach in ihrem Verhalten in das Muster der Linkerinsertionen P1*Cm*#5-11/80-8 und P1*Cm*#5-11/122-1 ein, und wie dort ist die fehlende Infektivität eher auf einen Defekt im Aufbau der kompletten Schwanzfaser als auf eine einfache Konformationsänderung zurückzuführen.

Während die Gene *S* und *19* eindeutig für die primären Schwanzfaserproteine von Mu bzw. P1 und P7 kodieren, ist die Rolle der kleinen Gene *U* und *U'* bzw. *tfs* und *tfs'* weniger eindeutig. *Amber* Mutationen im *U* Gen des Phagen Mu zeigten, daß dieses Gen für die Infektivität der Phagen in G(+) Orientierung benötigt wird (Howe et al., 1979; Grundy und Howe, 1984), und Insertionen des Kn-Fragments in *tfs* bestätigen auch für P1 und P7 die Bedeutung dieses Gens für den Aufbau des Schwanzfaserkomplexes. Die Insertionsmutanten in *tfs* zeigen, daß der COOH-Terminus dieses Genprodukts für seine Funktion offensichtlich eine weniger bedeutsame Rolle spielt (P1*Cm*#5-108/12) als der NH_2-Terminus, obwohl auch mit P1*Cm*#5-11/9-2 noch eine Linkermutante erhalten wurde, die die Bildung schwach infektiöser Phagenpartikel zuläßt. Homologie und Austauschbarkeit von *U* und *tfs* bzw. *U'* und *tfs'* lassen vermuten, daß die entsprechenden Gene in beiden Phagen den gleichen Zweck zu erfüllen haben. Hierfür müssen mehrere Möglichkeiten in Betracht gezogen werden.
Van de Putte et al., (1980) vermuten aufgrund der Analyse von Mu*G(+)* und Mu*G(-)* Phagenpartikeln, die charakteristische Proteine für jede G-Segment Orientierung lieferte, daß es sich bei U und U' um strukturelle Phagenproteine handelt. Dies ist denkbar, obwohl für P1 entsprechende Proteine bisher nicht nachgewiesen wurden. In diesem Fall könnte es

sich bei U und U' beispielsweise um Proteine der Basisplatte handeln, die für die Anheftung der Schwanzfaser verantwortlich zeichnen, oder die Proteine könnten sich, ähnlich wie es für das Genprodukt (gp) 36 des Phagen T4 beobachtet wird, das mit dem NH_2-Terminus von gp37, der distalen Hälfte der Schwanzfaser assoziiert ist (Ward et al., 1970), an den NH_2-Terminus von S bzw. S' anlagern. Der unterschiedliche Aufbau des Schwanzfaserkomplexes von Mu und P1 sowie die Austauschbarkeit von *U* und *tfs* lassen jedoch diese Möglichkeiten unwahrscheinlich erscheinen. Die Schwanzfaser von P1 gleicht mit ihrem charakteristischen Knick (Walker und Walker, 1983) in ihrem Aufbau eher den T Phagen, während elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mu nur eine gerade, relativ kurze Schwanzfaser zeigen (Grundy und Howe, 1984; Sandulache, 1985). Die gemeinsame Komponente der Schwanzfasern von Mu und P1 findet sich in deren variablen Anteilen, während der NH_2-Terminus kaum Gemeinsamkeiten erkennen läßt. Die Austauschbarkeit von *U* und *tfs* würde daher bedeuten, daß diese hochhomologen Proteine mit den verschiedenartigen NH_2-Termini von *S* und *19* in gleicher Weise in Wechselwirkung treten können. Auf der anderen Seite sollten sich U und U' trotz ihrer stark voneinander abweichenden Aminosäure-Zusammensetzung am COOH-Terminus im Falle einer solchen Wechselwirkung mit dem konstanten NH_2-Terminus der Schwanzfaser gegenseitig komplementieren können. Aufgrund der Beobachtung, daß *gin*$^+$ *U amber* Mutanten von Mu eine höhere Plattierungseffizienz auf Wirten für Mu*G(+)* zeigen als *gin*$^-$ *U amber* Mutanten, was auf eine Komplementation von *U* durch *U'* zurückzuführen sein könnte, wird diese Möglichkeit von Grundy und Howe (1984) diskutiert. Eine erhöhte Infektivität der Mutante P1*Cm*#5-9, die eine Insertion in *tfs* trägt und ebenfalls in einer Mischung der beide Orientierungen des C-Segments vorliegt, wurde jedoch im Vergleich mit anderen in Gen *19* defekten Phagen nie beobachtet, so daß eine Komplementation in nennenswertem Umfang eher unwahrscheinlich erscheint. Eine

endgültige Beantwortung dieser Frage kann jedoch nur durch *in vitro* Experimente mit den gereinigten Schwanzfaserkomponenten erfolgen, oder besser, wenn es gelingt, durch genetische Manipulation die Anordnung von *U* und *U'* oder *tfs* und *tfs'* zu vertauschen.
Näher liegt dagegen eine Wechselwirkung dieser Genprodukte mit dem variablen Teil der Schwanzfaser, wobei beispielsweise eine Bindung entlang der Schwanzfaser erfolgen könnte, wodurch deren Struktur Stabilität verliehen werden könnte. Eine zweite Möglichkeit besteht in einer spezifischen Bindung dieser Proteine an den COOH-Terminus der Schwanzfaser, wobei erst ein solcher Komplex eine Infektivität gegenüber dem Wirtsorganismus bewirkt. Dies ist der Fall in den Phagen T2 und seinen Verwandten K3, Ox2 und M1, in denen sich gp38, dessen Gen ganz ähnlich *U* und *tfs* in Mu und P1 dem primären Schwanzfasergen benachbart ist, an dessen COOH-Terminus anlagert, und auf diese Weise Einfluß auf den Wirtsbereich des Phagen nimmt (Riede et al., 1985; Riede et al., 1987a; Montag et al., 1987). Ein solcher Einfluß konnte allerdings bei den Kreuzungsexperimenten zwischen *U* und *tfs* niemals festgestellt werden, so daß mit hoher Wahrscheinlichkeit dem COOH-Terminus von S und 19 die entscheidende Rolle für die Wirtsspezifität der Phagen zugeschrieben werden kann. Eine Verwandtschaft von *U* oder *U'* mit Gen *38* von T2 konnte nicht nachgewiesen werden. Gen*38* codiert mit 260 Aminosäuren (Riede et al., 1987b) für ein um ungefähr 80 Aminosäuren längeres Protein als *U* oder *tfs* und ein Sequenzvergleich zwischen diesen Genen oder ihren Genprodukten zeigte keine signifikante Homologie (Resultate nicht gezeigt).
Es ist denkbar, daß es sich bei den Genprodukten von *U* bzw. *tfs* nicht oder nicht ausschließlich um Strukturproteine, sondern um Proteine mit einer modifizierenden Funktion handelt. Die primären Schwanzfaserproteine könnten möglicherweise prozessiert werden, so daß die von van de Putte et al. (1980) beobachteten orientierungsabhängigen

Proteinbanden die Spaltprodukte einer so prozessierten Schwanzfaser darstellen würden. Die Prozessierung eines Schwanzfaserproteins wurde kürzlich für den Phagen T2 beschrieben, wobei das für diesen Prozeß verantwortliche Enzym allerdings noch nicht identifiziert werden konnte (Drexler et al., 1986).

Einen anderen Fall eines modifizierenden Proteins stellt gp38 des Phagen T4 dar, das katalytisch die Dimerisierung von gp37, der distalen Hälfte der T4 Schwanzfaser bewirkt und nicht als strukturelles Protein auftritt (für Review s. Wood und King, 1979). Gen *38* liegt in gleicher genomischer Anordnung zu Gen *37* wie *U* und *tfs* zu *S* bzw. *19* und ist diesen in seiner Länge (183 Aminosäuren; Oliver und Crowther, 1981; Montag et al., 1987), sehr ähnlich. Da vieles in den bisherigen Ergebnissen darauf hindeutet, daß auch in P1 und Mu die Schwanzfasern multimere Moleküle darstellen, erscheint eine katalytische Funktion von U und Tfs ähnlich derjenigen von gp38 von T4 durchaus wahrscheinlich. Die genomische Anordnung von *U* bzw. *tfs* relativ zu den primären Schwanzfasergenen *S* bzw. *19* und die Beobachtung, daß der COOH-Terminus dieser Genprodukte flexibler erscheint als der NH_2-Terminus, legen eine Wechselwirkung des NH_2-Terminus mit dem COOH-Terminus der Schwanzfaserproteine nahe, die ihrerseits, wie die Insertionsmutagenese gezeigt hatte, ebenfalls sehr empfindlich gegenüber strukturellen Veränderungen reagieren. Eine gleichzeitige Bindung dieser Genprodukte an die Schwanzfaser könnte dieser zusätzliche Stabilität verleihen und gleichzeitig die Ergebnisse von van de Putte et al. (1980) erklären. Obwohl diese Hypothese nach dem jetzigen Stand der Erkenntnisse durchaus plausibel erscheint, lassen sich jedoch auch die anderen angesprochenen Möglichkeiten noch nicht mit letzter Sicherheit ausschließen. Um ein detaillierteres Bild über die Wirkungsweise von U oder Tfs zu erhalten, bedarf es klarer Weise zusätzlicher Experimente wie z. B. einer *in vitro* Analyse der gereinigten Schwanzfaserkomponenten.

Die hohe Flexibilität der Schwanzfasern, die eine rasche Anpassung an die sich ständig ändernden Umweltbedingungen ermöglicht, macht diese Proteine gleichzeitig zu einem ausgezeichneten Modell, an dem die Wechselwirkungen zwischen Struktur und Funktion untersucht werden können. Die vorliegende Arbeit zeigt bereits, daß die Schwanzfasern Bereiche unterschiedlicher struktureller und funktioneller Information enthalten, die auf äußere manipulative Eingriffe verschieden empfindlich reagieren. Diese Versuche schaffen die Grundlage weiterer gezielter Veränderungen der Schwanzfaser. Ein Ziel zukünftiger Untersuchungen wird es daher sein, die Spezifität der Rezeptorbindung durch definierte Mutationen zu variieren. Einen weiteren Ansatzpunkt der strukturellen Analyse stellen Mutationen wie die Deletion in P1/P7#2-34 dar, die noch eine Restaktivität aufweisen. Hier wäre es interessant, ob und auf welche Weise solche Mutanten zusätzlich stabilisiert werden können. Eine Gruppe der beschriebenen Linkerinsertionen verursacht anscheinend Defekte in der Morphogenese der Schwanzfaser. Hier stellt sich vor allem die Frage nach dem periodischen Aufbau der Schwanzfasermoleküle, der Anzahl und Art der Aminosäuren, die eine solche Periodizität erhalten und fortführen, und den strukturellen Unterschieden zu den Domänen, die gegenüber solchen Insertionen anscheinend toleranter reagieren.

Manipulationen wie die oben beschriebenen, die nur unter erheblichem Aufwand im Labor durchgeführt werden können, gehören, wie besonders gut am Beispiel der drei Schwanzfasergene von P1, P7 und Mu gezeigt werden kann, zu den gängigen Evolutionsmechanismen der Natur. Obwohl Mu mit den Phagen P1 und P7 nicht verwandt ist, findet sich sein G-Segment in gut konservierter Form als Teil des invertierbaren C-Segments dieser Phagen wieder (Abb. 27). Dies zeigt die Möglichkeiten, ganze Gene oder Genkomplexe in einem horizontalen Gentransfer auf unverwandte Systeme zu übertragen. Die Inversion des G- bzw. C-Segments erfolgt in

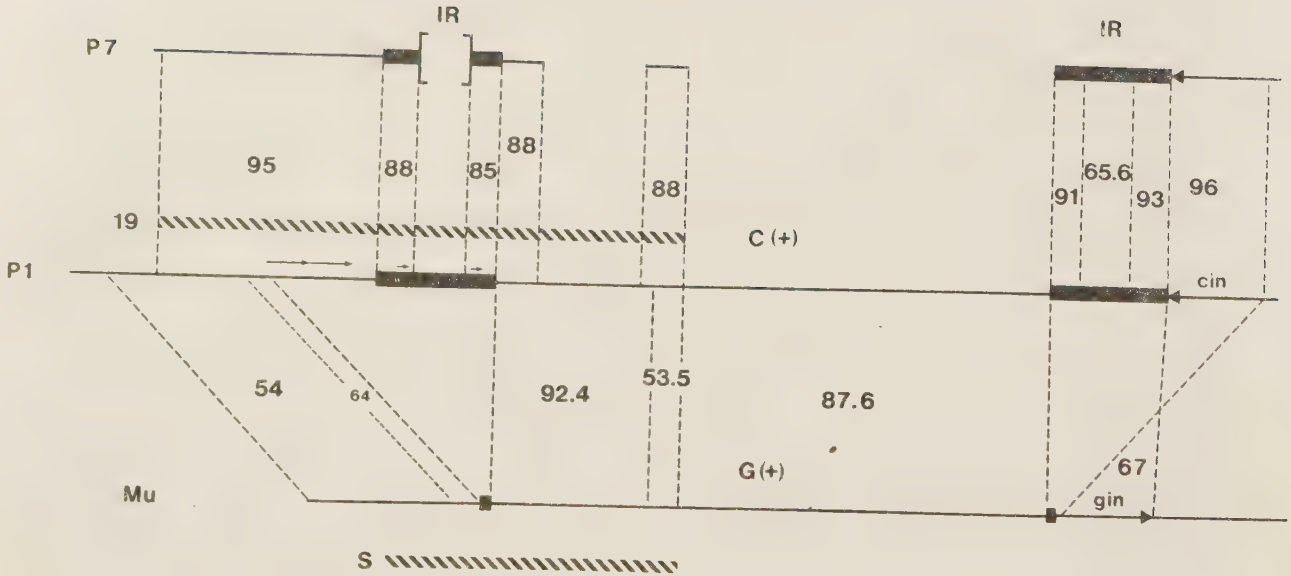


Abb. 27. Sequenzhomologien auf DNA Ebene (%) zwischen den Inversionssystemen der Bakteriophagen P1, P7 und Mu. Die gegenläufigen Orientierungen des cin bzw. gin Gens sind durch Pfeilspitzen angezeigt. Pfeile oberhalb der P1 Sequenz kennzeichnen die direkten Sequenzwiederholungen innerhalb von P1 und P7.

allen Phagen durch die diesem Segment benachbarten Inversionsfunktionen *gin* bzw. *cin*. Diese stark homologen, sich gegenseitig komplementierenden Rekombinationsfunktionen liegen in entgegengesetzter Orientierung bezüglich ihres zu invertierenden Segments. Dies schlägt eine Brücke zu der ebenfalls verwandten *hin* Funktion, die die Phasenvariation in *Salmonella* kontrolliert (Silverman und Simon, 1983). Das *hin* Gen gefindet sich selbst innerhalb eines invertierbaren Segments, und dies führt zu der Annahme, daß auch *gin* und *cin* früher invertierbar waren und erst im Laufe der Evolution in ihrer Position fixiert wurden (Kamp et al., 1984).

Das G-Segment von Mu wird von kurzen, 34bp langen IRs flankiert, denen 640bp lange IRs bei P1 gegenüberstehen. In beiden Fällen stellen die IRs die Substrate für die sequenzspezifischen Rekombinationsfunktionen dar, und ihre äußeren Enden sind in Übereinstimmung mit der Austauschbarkeit dieser Funktionen stark homolog. Die Sequenzdaten für P7 zeigen eindeutig, daß dessen verkürzter IR durch Deletion aus einem der langen IRs entstanden sein muß. Dies wird unterstrichen durch die geringe Homologie zwischen den langen IRs von P1 und P7 in genau dem Bereich, der in dem kurzen IR von P7 deletiert wurde (Abb. 27). Die IRs von P1 weisen untereinander kaum Basenaustausche auf, so daß sie ihre Homologie vermutlich gegenseitig bedingen. Vermutlich erst nach dem seltenen Ereignis einer Deletion begann der lange IR von P7, möglicherweise als Folge fehlender Basenpaarung mit seinem Gegenüber, zu mutieren. Aufgrund der starken Homologie der äußeren und inneren Enden der IRs von Mu und P1 ist es wahrscheinlich, daß auch die kurzen IRs von Mu durch eine spezifische Deletion aus den langen IRs von P1 hervorgegangen sind, wobei dieser Vorgang möglicherweise unter Mitwirkung der sequenzspezifischen Rekombinationsfunktionen erfolgt sein könnte.

Wenig Homologie zeigen die konstanten Bereiche der Schwanzfasergene von Mu und P1, jedoch existiert ein kurzer

Bereich signifikanter Übereinstimmung (64%) in ungefähr gleichem Abstand vom NH_2-Terminus (Kamp et al., 1984; Abb. 27). Auch dies läßt einen gemeinsamen Ursprung der Schwanzfasergene vermuten. Der konstante Teil der Mu Schwanzfaser ist nur ungefähr halb so lang wie in P1. Die internen Sequenzwiederholungen in der Schwanzfaser von P1 in und vor dem IR zeigen, daß die Evolution dieses Gens zunächst eine Duplikation bestimmter DNA-Sequenzen beinhaltete, und es hat den Anschein, daß in Mu gerade diese duplizierten Einheiten, die sich zwischen dem kurzen Homologiebereich und dem IR befinden, deletiert wurden. Man kann daraus eine allgemeine Entwicklung der Schwanzfasergene ableiten, die von P1 zu Mu verläuft. P7 stellt, was den IR betrifft, hierbei eine Art Übergang zwischen diesen beiden Typen dar. Der Phage Mu besitzt somit die seinen Verhältnissen am besten angepaßte Schwanzfaser, indem alle entbehrlichen Gensequenzen deletiert wurden.

Der Bereich geringster Homologie zwischen den invertierbaren Segmenten von Mu und P1 findet sich in den COOH-terminalen Enden von *S* und *19*, die als Rezeptorbindungsstellen identifiziert werden konnten (Abb. 27). Dies spiegelt sich offensichtlich in den unterschiedlichen Strukturen der primär erkannten Rezeptoren wieder. Jedoch finden sich die primären Rezeptoren von P1 und P7 als sekundäre Rezeptoren in Mu wieder. Über die Richtung der Evolution der Rezeptorbindungsstellen in diesen drei Systemen lassen sich nur schwer Aussagen treffen. Möglich ist sowohl, daß sich die relativ unspezifischen Rezeptorbindungsstellen von P1 und P7 ausgehend von den sekundären Rezeptoren in Mu entwickelt haben, ebenso wahrscheinlich ist jedoch eine Spezialisierung auf eine einzige Rezeptorstruktur in Mu, nämlich eine α1-2 gebundene Glucose.

Unter ökonomischen Gesichtspunkten erscheint die Entwicklung hin zu einer weniger spezialisierten Schwanzfaser, wie sie P1 besitzt, sinnvoller. Hier scheint die Schwanzfaser 19 die Funktion von 19′ zusätzlich übernommen zu haben. Eine solche

Entwicklung würde ein invertierbares Segment, das die Bildung von zwei verschiedenen Schwanzfasermolekülen ermöglicht, langfristig überflüssig machen und die Entstehung von Phagen mit nur einem Schwanzfasertyp wie den lambdoiden oder den T Phagen begünstigen. Andererseits birgt eine zu unspezifische Bindung die Gefahr, daß solche Phagen auch durch Bakterienstämme inaktiviert werden, die nur einen geeigneten Rezeptor besitzen, die aber aus anderen Gründen nicht als Wirte fungieren können. Bei einer hohen Rezeptorspezifität ist dagegen die Wahrscheinlichkeit groß, daß mit dem geeigneten Rezeptor auch der richtige Wirt getroffen wird. Möglicherweise stellt das invertierbare Segment in Mu einen Kompromiß zwischen hochspezialisierter und unspezifischer Schwanzfaser dar, indem ein breites Erkennungsspektrum an Rezeptoren durch zwei verschiedene Schwanzfasern mit jeweils relativ hoher Spezifizität erreicht wird.

F Literatur

Appleyard, R.K. (1954) Segregation of Lambda lysogenicity during bacterial recombination in *E. Coli* K 12. *Genet.* 39, 429-439.

Arscott, P.G. & Goldberg, E.B. (1976) Cooperative action of the T4 tail fibers and baseplate in triggering conformational change and in determining host range. *Virology* 69, 15-22.

Austin, S., Sternberg, N. & Yarmolinsky, M. (1978) Miniplasmids of bacteriophage P1. I. Stringent plasmid replication does not require elements that regulate the lytic cycle. *J. Mol. Biol.* 120, 297-309.

Bächi, B. & Arber, W. (1977) Physical mapping of BglII, BamHI, EcoRI, HindIII und PstI restriction fragments of bacteriophage P1 DNA. *Mol. Gen. Genet.* 153, 311-324.

Beckendorf, S.K. (1973) Structure of the distal half of the bacteriophage fiber. *J. Mol. Biol.* 73, 37-53.

Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62, 293-300.

Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. & Boyer, H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.

Bradley, D.E. (1970) A comparative study of some properties of the øX174 type bacteriophages. *Can. J. Microbiol.* 16, 965-971.

Bukhari, A.I. & Ambrosio, L. (1978) The invertible segment of bacteriophage Mu DNA determines the adsorption properties of Mu particles. *Nature* 271, 575-577.

Chesney, R.H. & Scott, J.R. (1975) Superinfection immunity and prophage repression in phage P1. II. Mapping of the immunity-difference and ampicillin-resistance loci of P1 and øAmp. *Virology* 67, 375-384.

Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1978) Prediction ot the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* 47, 45-148.

Chow, L.T. & Bukhari, A.I. (1976) The invertible DNA segments of coliphages Mu and P1 are identical. *Virology* 74, 242-248.

Chow, L.T., Kahmann, R. & Kamp, D. (1977) Electronmicroscopic characterization of DNAs of non-defective deletion mutants of bacteriophage Mu. *J. Mol. Biol.* 113, 591-609.
Chow, L.T., Broker, T.R., Kahmann, R. & Kamp, D. (1978) Comparison of the G DNA inversion in bacteriophages Mu, P1 and P7. In: *Microbiology* (Schlessinger, D. ed.) pp 55-56.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114

Crawford, J.T. & Goldberg, E.B. (1977) The effect of baseplate mutations on the requirement for tail-fiber binding for irreversible adsorption of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 111, 305-313.

Drexler, K., Riede, I. & Henning, U. (1986) Morphogenesis of the long tail fibers of bacteriophage T2 involves proteolytic processing of the polypeptide (gene product 37) constituting the distal part of the fiber. *J. Mol. Biol.* 191, 267-272.

Earnshaw, W.C. , Goldberg, E.B. & Crowther, R.A. (1979) The distal half of the tailfibre of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 132, 101-131.

Faelen, M., Toussaint, A., Lefebvre, N., Mergeay, M., Thiry, G. & Braibson-Thiry, J. (1981) Certaines souches de Erwinia sont sensibles au bacteriophage Mu. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochemie* 89B, 55-56.

Franklin, N.C. (1969) Mutation in *gal U* gene of *E. coli* blocks phage P1 infection. *Virology* 38, 189-191.

Giphart-Gassler, M. Plasterk, R. & van de Putte, P. (1982) G inversion in bacteriophage Mu: a novel way of gene splicing. *Nature* 297, 339-342.

Goldberg, E. (1983) Recognition, attachment, and injection. In: *Bacteriophage T4* (Mathews, C.K., Kutter, E.M., Mosig, G. & Berget, P.B., eds.) pp. 32-39, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Grindley, N.D.F. & Reed, R. (1985) Transpositional recombination in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 863-896.

Grundy, F.J. & Howe, M.M. (1984) Involvement of the invertible G segment in bacteriophage Mu tailfibre biosynthesis. *Virology* 134, 296-317.

Hartmann, H. & Goebel, W. (1977) A new restriction enzyme from *Enterobacter Cloacae* (EclI). *FEBS Lett.* 80, 285-287.

Hiestand-Nauer, R. & Iida, S. (1983) Sequences of the site-specific recombinase gene *cin* and of its substrates serving in the inversion of the C segment of bacteriophage P1. *EMBO J.* 2, 1733-1740.

Howe, M.M., Schumm, J.W. & Taylor, A.L. (1979) The *S* and *U* genes of bacteriophage Mu are located in the invertible G segment of Mu DNA. *Virology* 92, 108-124.

Hsu, M.T. & Davidson, N. (1974) Electron microscopy heteroduplex study of the heterogeneity of Mu phage and prophage DNA. *Virology* 58, 229-239.

Huber, H.E., Iida, S. & Bickle, T.A. (1985) Expression of the bacteriophage P1 *cin* recombinase gene from its own and heterologous promoters. *Gene* 34, 63-72.

Hull, R.A., Gill, G.S. & CurtisIII, R. (1978) Genetic characterization of Mu like bacteriophage D108. *Virology* 27, 513-518.

Iida, S. (1984) Bacteriophage P1 carries two related sets of genes determining its host range in the invertible C segment of its genome. *Virology* 134, 421-434.

Iida, S. & Arber, W. (1979) Multiple physical differences in the genome structure of functionally related bacteriophages P1 and P7. *Mol. Gen. Genet.*, 173, 249-261.

Iida, S., Meyer, J., Kennedy, K.E. & Arber, W. (1982) A site-specific conservative recombination system carried by bacteriophage P1. Mapping the recombinase gene *cin* and the crossover *cix* for the inversion of the C segment. *EMBO J.* 1, 1445-1453.

Iida, S., Hiestand-Nauer, R., Meyer, J. & Arber, W. (1985) Crossover sites *cix* for inversion of the invertible DNA segment C on the bacteriophage P7 genome. *Virology* 143, 347-351.

Ikeda, H. & Tomizawa, J.I. (1969) Prophage P1, an extrachromosomal replication unit. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33, 791-798.

Jansson, P.-E., Lindberg. A.A., Lindberg, B. & Wollin, R. (1981) Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from enterobacteriaceae. *Eur. J. Biochem.* 115, 571-577.

Kahmann, R. & Kamp,D. (1987) Sequence of the right end of Mu. In: Phage Mu (Symonds, N., Toussaint, A., van de Putte, P. & Howe, M., eds.) pp. 297-308, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Kahmann, R., Kamp, D. & Zipser, D. (1976) Transfection of *Escherichia coli* by Mu DNA. *Mol. Gen. Genet.* 149, 323-328.

Kamp, D. (1981) Invertible deoxyribonucleic acid: the G segment of bacteriophage Mu. In: *Microbiology 1981* (Schlessinger, D. ed.) pp 73-76, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Kamp, D. & Kahmann,R. (1981) The relationship of two invertible segments in bacteriophage Mu and *Salmonella typhimurium* DNA. *Mol. Gen. Genet.* 184, 564-566.

Kamp, D. & Sandulache, R. (1983) Recognition of cell surface receptors is controlled by invertible DNA of phage Mu. *FEMS Microbiol. Lett.* 16, 131-135.

Kamp, D. & Stern, B. (1981) 'Receptor-independent' infection of MuG(-) phage in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* 37, 387-390.

Kamp, D., Kahmann, R., Zipser, D., Broker, T.R. & Chow, L.T. (1978) Inversion of the G DNA segment of phage Mu controls phage infectivity. *Nature* 271, 577-580.

Kamp, D., Chow, L.T., Broker, T.R., Kwoh, D., Zipser, D., & Kahmann, R. (1979) Site-specific recombination in phage Mu. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 1159-1167.

Kamp, D., Kardas, E., Ritthaler, W., Sandulache, R., Schmucker, R. & Stern, B. (1984) Comparative analysis of invertible DNA in phage genomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 94, 301-311.

Kardas, E. (1984) Identifizierung der Schwanzfasergene des Phagen P1. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München

Kato, H., Fujisawa, H. & Minagawa, T. (1985) Purification and characterization of gene 17 product of bacteriophage T3. *Virology* 146, 22-26.

Kutsukake, K. & Iino, T. (1980) Inversions of specific DNA segments in flagellar phase variation in *Salmonella* and inversion systems of bacteriophages P1 and Mu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7338-7341.

Lee, H.J., Ohtsubo, E., Deonier, R.C. & Davidson, N. (1974) Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli*. V. ilv^+ deletion mutants of F14 *J. Mol. Biol.* 89, 589-597.

Lindberg, A.A. (1973) Bacteriophage receptors. *Ann. Rev. Microbiol.* 27, 205-241.

Lindberg, A.A. (1977) Bacterial surface carbohydrates and phage adsorption. In: *Surface carbohydrates of the procaryotic cells* (Sutherland, I.W. ed.) pp 289-356, Acad. Press, N.Y. and London.

Lugtenberg, B. & van Alphen, L. (1983) Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 737, 51-115.

Mäkelä, P.H. & Stocker, B.A.D. (1984) Genetics of lipopolysaccharide. In: *Handbook of Endotoxin* (Rietschel, E.T., ed.) Vol. I, pp. 59-137, Elsevier, Amsterdam.

Mandel, M. & Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53 159-162.
Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages. *Methods in Enzymology* 65, 499-560.

Messing, J. & Vieira, J. (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either strand of double-digest restriction fragments. *Gene* 19, 269-276.

Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Montag, D., Riede, I., Eschbach, M.-L., Degen, M. & Henning, U. (1987) Receptor-recognizing proteins of T-even type bacteriophages. Constant and hypervariable regions and an unusual case of evolution. *J. Mol. Biol.* 196, 165-174.

Nishikawa, K. (1983) Assessment of secondary-structure prediction of proteins. Comparison of computerized Chou-Fasman method with others. *Biochim. Biophys. Acta* 748, 285-299.

Oka, A., Sugisaki, H. & Takanomi, M. (1981) Nucleotide Sequence of the Kanamycin Resistance Transposon 903. *J. Mol. Biol.*, 147, 217-226.

Oliver, D.B. & Crowther, R.A. (1981) DNA sequence of the tail fiber genes 36 and 37 of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 153, 545-568.

Plasterk, R.H.A., Brinkman, A. & van de Putte, P. (1983) DNA inversions in the chromosome of *Escherichia coli* and in bacteriophage Mu: Relationship to other site-specific recombination systems. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5355-5358.

Plasterk, R.H.A. & van de Putte, P. (1985) The invertible P-DNA segment in the chromosome of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 4, 237-242.

Prehm, P., Schmidt, G., Jann, B. & Jann, K. (1976) The cell-wall lipopolysaccharide of *Escherichia coli* K-12. Structure and acceptor site for O-antigen and other substituents. *Eur. J. Biochem.* 70, 171-177.

Prentky, P., Chandler, M. & Caro, L. (1977) Replication of the prophage P1 during the cell cycle of *Escherichia coli*. *Mol.Gen.Genet.* 152, 71-76.

van de Putte, P., Cramer,S. & Giphart-Gassler, M. (1980) Invertible DNA determines host specificity of Bacteriophage Mu. *Nature* 286, 218-222.

van de Putte, P., Plasterk, R. & Kuijpers, A. (1984) A Mu *gin* complementing function and an invertible DNA region in *Escherichia coli* K-12 are situated on the genetic element e14. *J. Bacteriol.* 158, 517-522.

Riede, I., Degen, M. & Henning, U. (1985) The receptor specificity of bacteriophages can be determined by a tail fiber modifying protein. *EMBO J.* 4, 2343-2346.

Riede, I., Drexler, K., Schwarz.H. & Henning, U. (1987a) T-even type phages can use an adhesin for recognition of cellular receptors. *J. Mol. Biol.* 194, 23-30.

Riede, I., Drexler, K., Eschbach, M.-L., & Henning, U. (1987b) DNA sequences of genes 38, encoding a receptor recognizing protein of bacteriophages T2, K3 and of K3 host range mutants. *J. Mol. Biol.* 194, 31-39.

Ritthaler, W. (1983) Untersuchungen über die Inversion des G-Segments im Bakteriophagen P1 Genom. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ritthaler, W. & Kamp,D. (1988) DNA sequence of the site-specific recombination function *cin* of phage P7. *Nucl. Acids Res.*, 16, 6246.

Rosner, J.L. (1972) Formation, induction, and curing of bacteriophage P1 lysogens. *Virology* 48, 679-689.

Saedler, H. & Starlinger, P. (1967) O^{o} Mutation in the galactose operon in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 100, 178-189.

Sandulache, R. (1985) Der genetische Konyrollmechanismus des Wirtsbereichs beim Bakteriophagen Mu. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Sandulache, R., Prehm, P. & Kamp, D. (1984) Cell wall receptor for bacteriophage MuG(+). *J. Bacteriol.* 160, 299-303.

Sandulache, R., Prehm, P., Expert, D., Toussaint, A. & Kamp, D. (1985) The cell wall receptor for bacteriophage MuG(-) in *Erwinia* and *Escherichia coli* C. *FEMS Microbiol. Lett.* 28, 307-310.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F. & Petersen, G.P. (1982) Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. *J. Mol. Biol.* 162, 729-773.

Schindler, M. & Osborn, M.J. (1979) Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry* 18, 4425-4430.

Schmucker, R. (1986) Charakterisierung der Inversionsstelle des invertierbaren Segments des Bakteriophagen Mu. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Schmucker, R., Ritthaler, W., Stern, B. & Kamp, D. (1986) DNA inversion in bacteriophage Mu: characterization of the inversion site. *J. gen. Virol.* 67, 1123-1133.

Scott, J. R., Kropf, M. & Mendelson, L. (1977) Clear plaque mutants of phage P7. *Virology*, 76, 39-46.

Sengstag, C. & Arber, W. (1983) The sequence of the bacteriophage P1 genome region serving as a hot target for IS2 insertion. *EMBO J.* 10, 1777-1781.

Shaw, E.J., Bingham, H., Fuerst, C.R. & Pearson, M.L. (1977) The multisite character of host-range mutations in bacteriophage λ. *Virology* 83, 180-194.

Simon, M., Zieg, J., Silverman, M., Mandel, G. & Doolittle, R. (1980) Genes whose mission is to jump. *Science* 209, 1370-1374.

Smith, H.W. (1972) Ampicillin-resistance in *Escherichia coli* by phage infection. *Nature New Biol.* 238, 205-206.

Sternberg, N. & Hoess, R. (1983) The molecular genetics of bacteriophage P1. *Ann. Rev. Genet.* 17, 123-154.

Stougaard, P. & Molin, S. (1981) Vertical dye-buoyant density gradients for rapid analysis and preparation of plasmid DNA. *Anal. Biochem.* 118, 191-193.

Sugden, B., DeTroy, B., Roberts, R.J. & Sambrook, J. (1975) Agarose slab-gel electrophoresis equipment. *Anal. Biochem.* 68, 36-46.

Symonds, N. & Coelho, A. (1978) Role of the G segment in the growth of phage Mu. *Nature* 271, 273-274.

Taylor, L.A. & Rose, R.E. (1988) A correction in the nucleotide sequence of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC-4K. *Nucl. Acids Res.* 16, 358.

Tomas, J.M. & Kay W.W. (1984) Effect of bacteriophage P1 lysogeny on lipopolysaccharide composition and the Lambda receptor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159, 1047-1052.

Tominaga, A. & Enomoto, M. (1986) Magnesium-dependent plaque formation by bacteriophage P1*cin*C(-) on *Escherichia coli* C and *Shigella sonnei*. *Virology* 155, 284-288.

Toussaint, A., Lefebvre, N., Scott, J.R., Cowan, J.A., de Bruijn, F. & Bukhari, A.I. (1978) Relationship between temperate phages Mu and P1. *Virology* 89, 146-161.

Vieira, J. & Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259-268.

Walker, D.H. & Anderson, T.F. (1970) Morphological variants of coliphage P1. *J. Virol.* 5, 765-782.

Walker, D.H., Jr. & Walker, J.T. (1976) Genetic studies of coliphage P1. II. Relatedness to P7. *J. Virol.* 19, 271-274.

Walker, J.T. & Walker, D.H., Jr. (1983) Coliphage P1 morphogenesis: analysis of mutants by electronmicroscopy. *J. Virol.* 45, 1118-1139.

Wandersman, C. & Yarmolinsky, M. (1977) Bipartite control of immunity conferred by the related heteroimmune plasmid prophages P1 and P7 (formerly ϕAmp). *Virology* 77, 386-400.

Ward, S. & Dickson, R.C. (1971) Assembly of bacteriophage T4 tail fibers. III. Genetic control of the major tail fiber polypeptides. *J. Mol. Biol.* 62, 479-492.

Ward, S., Luftig, R.B., Wilson, J.H., Eddleman, H., Lyle, H. & Wood, W.B. (1970) Assembly of bacteriophage tail fibers. II. Isolation and characterization of tail fiber precursors. *J. Mol. Biol* 54, 15-31.

Wood, W.B. & Henninger, M. (1969) Attachment of tail fibers in bacteriophage T4 assembly: Some properties of the reaction *in vitro* and its genetic control. *J. Mol. Biol.* 39, 603-618.

Wood, W.B. & King, J. (1979) Genetic control of complex bacteriophage assembly. In: *Comprehensive Virology* (Fraenkel-Conrat, H. & Wagner, R.R., eds.) Vol. 13, pp. 581-633, Plenum Publishing Corp., New York.

Wright, A., McConnell, M. & Kanegasaki, S. (1980) Lipopolysaccharide as a bacteriophage receptor. In: *Virus receptors* (Randall, L.L. & Philipson, L., eds.) pp. 29-57, Chapman and Hall, London and New York.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Yun, T. & Vapnek, D. (1977) Electron microscopic analysis of bacteriophages P1, P1*Cm*, and P7. *Virology* 77, 376-381.

Zieg, J. & Simon, M. (1980) Analysis of the nucleotide sequence of an invertible controlling element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4196-4200.

G Abkürzungen

AE	Adsorptionseinheit
Ap	Ampicillin
bp	Basenpaare
Cm	Chloramphenicol
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz
gp	Genprodukt
h	Stunde
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IR	Inverted Repeat
kbp	Kilobasenpaare
Kn	Kanamycin
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
PEG	Polyethylenglycol
pfu	plaque forming units
PNK	T4 Polynukleotidkinase
r	Resistenz, resistent
RF-DNA	Replicative Form der M13 DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
s	Sensitivität, sensitiv
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydoxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid

Lebenslauf

Name:	Wolfgang Ritthaler
Geburtsdatum:	16. Juni 1956
Geburtsort:	München
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

Ausbildung

1962 - 66	Grundschule an der Simmernstraße, München
1966 - 75	Maximiliansgymnasium München
1975 - 82	Studium der Chemie (Diplom) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1982 - 2/83	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
März 1983 - Jan. 1989	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried